

Université de Montréal

Stimulation électrique de la moelle épinière lombaire pour  
déclencher la marche chez le chat spinal.

par

Dorothy Barthélemy

Département de Physiologie

Faculté de médecine

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures  
en vue de l'obtention du grade de  
Philosophiae Doctor (Ph.D.)  
en Sciences Neurologiques

Avril 2006

© Dorothy Barthélemy, 2006



W

4

U58

2006

V. 055

## **AVIS**

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

## **NOTICE**

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal  
Faculté des études supérieures

Cette thèse intitulée :

Stimulation électrique de la moelle épinière lombaire pour  
déclencher la marche chez le chat spinal.

présentée par :  
Dorothy Barthélemy

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Dr John Kalaska, président-rapporteur  
Dr Serge Rossignol, directeur de recherche  
Dr Trevor Drew, membre du jury  
Dr François Clarac, examinateur externe  
Dr François Prince, représentant du doyen de la FES



## Résumé

Suite à une lésion de la moelle épinière au niveau thoracique, la locomotion volontaire des membres postérieurs est abolie chez le chat. Cependant, un réseau d'interneurones situés dans la moelle épinière lombaire, sous le niveau de la lésion, serait capable de générer un patron locomoteur en l'absence de signaux des voies supraspinales. Pour activer ce patron locomoteur, différentes approches sont utilisées et dans cette thèse, nous examinerons l'efficacité de la stimulation électrique de la moelle épinière pour évoquer la locomotion chez des chats spinaux d'une semaine non-entraînés (T13) et chez des chats spinaux entraînés à marcher sur un tapis roulant durant 3 à 5 semaines.

La stimulation intraspinale (tonique et par train) a été appliquée à l'aide d'une seule électrode à différentes latéralités et profondeurs des segments L3 à L7, pour déterminer les régions spinales les plus efficaces pour induire la locomotion. Cette stimulation a aussi été combinée à l'injection i.v. de clonidine, un agoniste noradrénergique  $\alpha_2$ . Des réponses non-locomotrices ipsilatérales, bilatérales ainsi que des réponses locomotrices ont été évoquées. La distribution des sites où ces réponses sont évoquées suit un gradient dans l'axe dorsoventral, médiolatéral et rostrocaudal. Après injection de clonidine, deux types de réponses locomotrices sont principalement observées: la locomotion du membre controlatéral qui est évoquée près de la ligne médiane et la locomotion bilatérale qui est induite par la stimulation des régions dorsales. Chez le chat spinal entraîné, la distribution des réponses non-locomotrices varie, mais la distribution des réponses locomotrices demeure stable.

Le patron locomoteur est déclenché par une stimulation tonique à faible intensité (20-90  $\mu$ A) et à basse fréquence (2-6 Hz), de même que par une stimulation électrique par train (0.65 à 1 train/s). La locomotion déclenchée chez les chats entraînés est plus régulière que celle évoquée chez les chats non-entraînés. De plus, le patron locomoteur varie selon le segment spinal stimulé, produisant une plus grande flexion vers l'avant pendant la phase de balancement lorsque les segments rostraux sont stimulés, et une plus longue extension pendant la phase d'appui quand les segments caudaux sont stimulés.

Pour mettre en lumière les mécanismes d'induction de la locomotion par la stimulation électrique intraspinale, différentes structures ont été stimulées, inactivées ou lésées. La stimulation des racines dorsales peut évoquer un patron locomoteur similaire à celui évoqué par la stimulation intraspinale, suggérant que les voies afférentes seraient impliquées dans la production de la locomotion par stimulation intraspinale. Des microinjections de yohimbine, antagoniste noradrénergique, au niveau des segments L3 et L4, ou une seconde lésion spinale dans ces segments, abolit toute activité locomotrice évoquée par la stimulation des segments plus caudaux. Des lésions dorsoventrales progressives à L3 ou L4 et des lésions ventrales à L4 suggèrent que l'intégrité du funicule ventral ou ventrolatéral et des segments L3-L4 sont essentielles pour déclencher la locomotion par stimulation intraspinale ou par stimulation des racines dorsales.

Ainsi, la combinaison d'un entraînement locomoteur, d'une thérapie pharmacologique et de la stimulation électrique pourrait être bénéfique pour améliorer les capacités locomotrices après lésion de la moelle épinière.

**Mots-clés:** chat spinal, microstimulation intraspinale, moelle épinière, locomotion, réponses motrices, clonidine, entraînement locomoteur, stimulation de racines dorsales, yohimbine, lésion spinale.

## Abstract

After a spinal cord injury at thoracic level, locomotion of the hindlimbs can no longer be expressed voluntarily. However it has been demonstrated that an autonomous spinal network in the lumbosacral cord, below the level of injury, is capable of generating a bilateral and alternating hindlimb locomotor pattern, without contribution of supraspinal pathways. To activate this network, different therapeutic approaches are used and in this thesis, we examined intraspinal microstimulation (ISMS) of the lumbar segments, as a novel tool to induce bilateral locomotion in chronically spinalized cats.

To determine the optimal sites in the spinal cord that would induce locomotion, ISMS was applied with a single electrode at different lateralities and depths in segments L3 to L7 in one-week untrained spinal cats (T13) and in three to five-week spinal cats that had recovered locomotion on the treadmill. The stimulation was used with and without clonidine, a noradrenergic  $\alpha_2$  agonist. Non-locomotor ipsilateral and bilateral responses, as well as locomotor responses were evoked. For each response, the distribution of effective spinal sites followed gradients in the rostrocaudal, mediolateral and dorsoventral axis. Two main types of locomotor responses were observed when clonidine was injected: contralateral hindlimb locomotion, which was mainly evoked medially, and bilateral locomotion, which was only evoked dorsally. In the trained spinal cat, distribution of non-locomotor responses varied somewhat from the untrained cat, but distribution of locomotor responses remained the same.

In combination with clonidine, tonic stimulation at low frequencies (2 to 6 Hz) and low intensity (20-90  $\mu$ A) was efficient to induce locomotion. Stimulation with trains of pulses were also efficient between 0.65 and 1 train/s. ISMS in trained animals induced a more regular locomotor pattern than in untrained animals. Furthermore, the locomotor pattern varied according to the spinal segment stimulated, exhibiting a larger forward flexion during swing when rostral segments were stimulated and a longer extension during stance when caudal segments were stimulated.

To determine how ISMS could evoke locomotion, stimulation, inactivation or lesioning of different spinal structures were performed. Dorsal root stimulation could evoke

a similar bilateral locomotion as is seen with ISMS, which suggests that afferent pathways are probably involved in the production of locomotion by ISMS. Microinjections of yohimbine, a noradrenergic antagonist, in L3 and L4 segments, or a complete second spinal lesion at L3 or L4 abolished all locomotor activity evoked by ISMS at more caudal segments. Progressive dorsoventral lesions at L3 or L4 or restricted ventral lesions at L4 suggest that the integrity of the ventral or ventrolateral funiculi and the integrity of segments L3-L4 are critical for the induction of locomotion by ISMS and by dorsal root stimulation.

Thus, a combination of locomotor training, pharmacology and electrical stimulation might be beneficial to enhance the spinal capacity of generating locomotion after spinal cord injury.

**Keywords:** spinal cat, intraspinal microstimulation, lumbar spinal cord, motor responses, locomotion, clonidine, locomotor training, dorsal root stimulation, entrainment, yohimbine, spinal lesion

## Table des matières

<b>TABLE DES MATIÈRES .....</b>	<b>VII</b>
<b>ABRÉVIATIONS .....</b>	<b>X</b>
<b>LISTE DES FIGURES.....</b>	<b>XII</b>
<b>CHAPITRE I - INTRODUCTION GÉNÉRALE .....</b>	<b>1</b>
<b>RECHERCHES SUR LES LÉSIONS DE LA MOELLE ÉPINIÈRE .....</b>	<b>1</b>
<b>PATRON CINÉMATIQUE DE LA LOCOMOTION.....</b>	<b>4</b>
<b>PATRON ÉLECTROMYOGRAPHIQUE DE LA LOCOMOTION .....</b>	<b>6</b>
EMG au cours de la phase d'appui .....	7
EMG au cours de la phase de balancement.....	8
<b>GÉNÉRATEUR SPINAL DU PATRON LOCOMOTEUR .....</b>	<b>9</b>
Évidences d'un réseau locomoteur spinal .....	9
Locomotion spinale chez le chat .....	10
Hypothèse sur le réseau locomoteur spinal .....	12
<b>LOCALISATION DES ÉLÉMENTS DU GÉNÉRATEUR DE PATRON LOCOMOTEUR.....</b>	<b>16</b>
Importance des segments lombaires moyens (L3-L4) chez le chat .....	16
Importance des segments lombaires rostraux chez différentes espèces.....	19
<b>CENTRES SUPRASPINAUX.....</b>	<b>20</b>
Région locomotrice mésencéphalique.....	21
Systèmes descendants .....	22
<b>ANATOMIE DE LA MOELLE ÉPINIÈRE .....</b>	<b>30</b>
Matière blanche.....	30
Matière grise .....	32
<b>COMPOSANTES DE LA CIRCUITERIE SPINALE DE LOCOMOTION.....</b>	<b>34</b>
Interneurones inhibiteurs Ia et cellules de Renshaw .....	34
Interneurones commissuraux .....	35

Interneurones FRA .....	35
Interneurones de groupe II .....	36
<b>AFFÉRENCES SENSORIELLES .....</b>	<b>39</b>
Afférences sensorielles nécessaires au déclenchement de la locomotion .....	40
Inputs sensoriels pouvant modifier la locomotion .....	42
<b>PHARMACOLOGIE DE LA MOELLE ÉPINIÈRE.....</b>	<b>45</b>
Système monoaminergique .....	45
Système glutamatergique .....	47
Système propriospinal cholinergique.....	48
Mécanismes inhibiteurs.....	49
<b>PLASTICITÉ .....</b>	<b>50</b>
Lésions musculaires .....	50
Lésion cutanée.....	51
Plasticité neurochimique .....	51
Plasticité des voies synaptiques .....	52
Formation de nouvelles connections.....	53
<b>NEUROPROTHÈSES.....</b>	<b>54</b>
Stimulation épidurale .....	56
Stimulation des racines dorsales .....	60
Stimulation intraspinale .....	61
<b>PROJET DE RECHERCHE .....</b>	<b>66</b>
<b>CHAPITRE II - ARTICLE #1 .....</b>	<b>68</b>
 <b>NON-LOCOMOTOR AND LOCOMOTOR HINDLIMB RESPONSES EVOKED BY ELECTRICAL MICROSTIMULATION OF THE LUMBAR CORD IN SPINALIZED CATS.....</b>	 <b>68</b>
ABSTRACT .....	70
INTRODUCTION .....	71
METHODS.....	74
RESULTS.....	80

DISCUSSION.....	93
ACKNOWLEDGEMENTS.....	104
BIBLIOGRAPHY .....	105
FIGURES .....	112
TABLES.....	125
<b>CHAPITRE III - ARTICLE #2.....</b>	<b>128</b>
<b>CHARACTERISTICS AND MECHANISMS OF SPINAL LOCOMOTION INDUCED BY INTRASPINAL MICROSTIMULATION AND DORSAL ROOT STIMULATION.....</b>	<b>128</b>
ABSTRACT.....	130
INTRODUCTION .....	131
METHODS.....	134
RESULTS.....	138
DISCUSSION.....	152
ACKNOWLEDGEMENTS.....	161
BIBLIOGRAPHY .....	162
FIGURES .....	168
TABLES.....	183
<b>CHAPITRE IV - DISCUSSION GÉNÉRALE .....</b>	<b>186</b>
RÉSUMÉ DES ARTICLES.....	186
MISE EN CONTEXTE DES RÉSULTATS .....	190
PERSPECTIVES CLINIQUES .....	198
CONCLUSION.....	206
<b>CHAPITRE V - BIBLIOGRAPHIE.....</b>	<b>207</b>

## Abréviations

<b>St</b>	Semitendinosus
<b>VL</b>	Vastus Lateralis
<b>Sart</b>	Sartorius
<b>IP</b>	Iliopsoas
<b>TA</b>	Tibialis Anterior
<b>GL</b>	Gastrocnemius Lateralis
<b>GM</b>	Gastrocnemius Medialis
<b>GS</b>	Gastrocnemius Soleus
<b>EDB</b>	Extensor Digitorum brevis
<b>L</b>	Left
<b>R</b>	Right
<b>F</b>	Flexion
<b>E</b>	Extension
<b>EMG</b>	Electromyogramme (Electromyogram)
<b>H</b>	Hip
<b>K</b>	Knee
<b>A</b>	Ankle
<b>MTP</b>	Metatarso phalangeal
<b>FE</b>	Foot extensor
<b>FF</b>	Foot flexor
<b>FRA</b>	Afférences de réflexe de flexion (Flexor reflex afferent)
<b>μA</b>	micro Ampère
<b>T</b>	Thoracique
<b>L</b>	Lombaire
<b>CPG</b>	Générateur de patron central (Central pattern generator)
<b>DR</b>	Racine dorsale (Dorsal Root)
<b>ISMS</b>	Microstimulation Intraspinale (Intraspinal microstimulation)
<b>Stim</b>	Stimulation
<b>MLR</b>	Région mésencéphalique locomotrice (Mesencephalic locomotor region)



<b>VSCT</b>	Voie spinocérébelleuse ventrale
<b>PPN</b>	Noyau pédonculopontique
<b>L-DOPA</b>	L-Dihydroxyphenylalanine
<b>NMDA</b>	N-méthyl D-aspartate
<b>AMPA</b>	$\alpha$ - amino-3-hydroxy-5-methyl-4 isoxazole acide propionique
<b>5-HT</b>	Sérotonine
<b>GABA</b>	gamma-amino butyric acid
<b>GAD67</b>	décarboxylase glutamic acid
<b>AP5</b>	D (-)-2 -amino -5 phosphonopentanoic acid

## Liste des figures

### Introduction générale

<i>Figure 1. Comparaison de la locomotion avant et après spinalisation chez le même chat à 0.4 m/s.....</i>	<i>5</i>
<i>Figure 2. Générateur de patron central.....</i>	<i>14</i>
<i>Figure 3. Localisation des groupes de motoneurones innervant les muscles des membres postérieurs dans le renflement lombosacré.....</i>	<i>17</i>
<i>Figure 4. Distribution des projections supraspinales dans la moelle épinière.....</i>	<i>23</i>
<i>Figure 5. Section transversale de la moelle épinière du chat au segment L7.....</i>	<i>31</i>
<i>Figure 6. Montage expérimental de la stimulation épidurale chez l'humain .....</i>	<i>57</i>
<i>Figure 7. EMG de l'activité locomotrice chez un sujet paraplégique lors d'une stimulation épidurale .....</i>	<i>58</i>
<i>Figure 8. Champs de force évoqués par la microstimulation des régions interneuronales de la moelle épinière de grenouille.....</i>	<i>62</i>

### Article #1

<i>Article1-Figure 1: Stimulated sites in segments L3 to L7 .....</i>	<i>112</i>
<i>Article1-Figure 2: Responses evoked along a typical stimulation track in a spinal cat .....</i>	<i>113</i>
<i>Article1-Figure 3: Ipsilateral responses evoked in different spinal cats injected with clonidine .....</i>	<i>114</i>
<i>Article1-Figure 4: Distribution of ipsilateral responses in the 4 conditions tested.....</i>	<i>115</i>
<i>Article1-Figure 5 Stimulated sites evoking ipsilateral responses in the 4 conditions tested .....</i>	<i>116</i>
<i>Article1-Figure 6: Bilateral responses evoked in an untrained spinal cat with clonidine .....</i>	<i>117</i>
<i>Article1-Figure 7: Distribution of bilateral response in the 4 conditions tested.....</i>	<i>118</i>

<i>Article1-Figure 8: Stimulated sites evoking bilateral responses in the 4 conditions tested</i>	119
<i>Article1-Figure 9: Locomotor responses evoked in three different untrained spinal cats with clonidine</i>	120
<i>Article1-Figure 10: Distribution of locomotor responses in the 4 conditions tested.....</i>	121
<i>Article1-Figure 11: Stimulated sites that induced unilateral locomotor responses in the 4 conditions tested</i>	122
<i>Article1-Figure 12: Stimulated sites that induced bilateral locomotion in the 4 conditions tested</i>	123
<i>Article1-Figure 13: Responses evoked along a stimulation track in an untrained spinal cat pre and post clonidine and in a trained spinal cat pre and post-clonidine</i>	124

## Article #2

<i>Article2-Figure 1- Locomotion induced by perineal and electrical stimulation in an untrained spinal cat with clonidine</i>	168
<i>Article2-Figure 2- Trains of pulses evoke contralateral locomotor activity in spinal cats.</i>	169
<i>Article2-Figure 3- Induction of locomotion by electrical stimulation</i>	170
<i>Article2-Figure 4- Effect of the segment stimulated on locomotion</i>	171
<i>Article2-Figure 5- Duration and length of the locomotor sequences displayed in Figure 4</i>	172
<i>Article2-Figure 6- Entrainment of the locomotor cycle</i>	173
<i>Article2-Figure 7- Non entrainment of the locomotor cycle</i>	174
<i>Article2-Figure 8- Distribution and effect of train stimulation</i>	175
<i>Article2-Figure 9- Comparison of ISMS and dorsal root stimulation at segment L7 in the same cat</i>	176
<i>Article2-Figure 10- Locomotion induced by dorsal root stimulation</i>	177
<i>Article2-Figure 11- Effect of intensity and frequency of stimulation on locomotion.....</i>	178
<i>Article2-Figure 12- Effects of intraspinal microinjections of yohimbine at L3-L4 on electrically induced locomotion in an untrained spinal cat</i>	179

<i>Article2-Figure 13-Effect of a spinal lesion at L2.....</i>	<i>180</i>
<i>Article2-Figure 14-Progressive spinal section in a trained spinal cat.....</i>	<i>181</i>
<i>Article2-Figure 15-Effect of bilateral rhizotomy at L3-L4 and of ventral lesion at L4 .</i>	<i>182</i>

### Discussion générale

<i>Figure 9- Matrice d'électrodes implantées.....</i>	<i>202</i>
<i>Figure 10-Locomotion avec support de poids induit par stimulation électrique chez un chat avec clonidine, un mois après spinalisation.....</i>	<i>203</i>

## Remerciements

Je remercie les membres du jury, Drs Trevor Drew, John Kalaska et François Clarac d'avoir accepté d'évaluer cette thèse dans un si court délai. À Trevor Drew qui a fait partie de mes comités de parrainage au cours du doctorat et de mon jury de maîtrise et de thèse, merci pour avoir accepté à chaque fois avec le sourire.

Je tiens à remercier chaleureusement Serge Rossignol, mon directeur de recherche, pour m'avoir accueillie dans son laboratoire. J'ai pu bénéficier de sa rigueur scientifique, son ouverture d'esprit et de sa confiance pour mener à bien ce projet. De plus, ses qualités humaines ont fait la différence à plusieurs reprises au cours de ce doctorat.

La contribution de Janyne Provencher et Hugues Leblond a été essentielle à la réalisation de ces travaux et de cette thèse. Merci d'avoir généreusement partagé vos connaissances avec moi. Quelles soient scientifiques ou culinaires!

A tous mes collègues du laboratoire, passés ou présents, avec qui j'ai bien rigolé tout au long de ce projet : Laurent, Cécile et maintenant la 'gang de gars du labo' Hugo, Greg et Alain. Votre aide, vos folies et vos rires ont été précieux pendant l'écriture de cette thèse. Je remercie également Myriam Antri pour ses commentaires pertinents et constructifs sur ce manuscrit, ainsi que Dorly Verdier pour ces conseils judicieux.

Merci à Philippe Drapeau, René Albert, France Lebel, Claude Gagner et Claude Gauthier pour m'avoir permis de profiter de leur expertise dans une atmosphère décontractée et plaisante.

Merci à Jeanne Lavoie, France Gauthier et Denis Sasseville pour leur support technique courtois et de qualité.

Merci à Suzanne Cabana pour sa disponibilité, ses conseils ainsi que pour des discussions mémorables lors du quart de travail de soir.

Je remercie aussi le GRSNC et le FRSQ pour le support financier durant mes années au doctorat.

Une pensée très spéciale à mes amis de Montréal et d'ailleurs pour leur soutien constant, pour leur présence dans les bons et moins bons moments et pour leur affection. Merci à vous tous.

Finalement merci à toute ma famille Wista, Pierre, Pierre-Emmanuel et Peggy qui ont été de fidèles alliés tout au long de mes études. Votre généreuse présence a compté plus que vous ne le croyez durant ces années et de nouveau au cours des derniers mois de rédaction. Vous êtes irremplaçables!

... Maman, tu es formidable!

## CHAPITRE I - INTRODUCTION GÉNÉRALE

---

Les lésions de la moelle épinière affectent la motricité et la sensation sous le niveau de la lésion. Chaque année 900 canadiens subissent des lésions de la moelle épinière et plus de 30 000 canadiens souffrent actuellement de paralysie des membres inférieurs (paraplégiques) ou des membres supérieurs et inférieurs (quadraplégiques)<sup>1</sup>. Une majorité de ces patients ont entre 16 et 30 ans et leur espérance de vie, principalement pour les patients souffrant de lésions au niveau de la moelle thoracique ou lombaire, n'est pas diminuée par rapport à celle de la population générale. Ils doivent donc vivre avec des séquelles permanentes incluant une diminution des fonctions motrices et sensorielles, une altération des réflexes et du tonus musculaire et une perturbation du contrôle volontaire des fonctions affectant la vessie, l'évacuation intestinale et la sexualité. Les signes et symptômes présentés par le patient dépendront de la sévérité de la lésion. Une lésion partielle de la moelle épinière entraînera des déficits plus ou moins grands selon son étendue : certaines voies motrices supraspinales descendantes et voies sensorielles ascendantes acheminant les informations de la périphérie (les sensations) au cerveau peuvent demeurer intactes. Une faiblesse musculaire et une somesthésie altérée sont alors observées. Si la lésion est complète, il y aura perte de toute sensation et de tout contrôle moteur volontaire sous le niveau de la lésion. Différents degrés de spasticité seront observés selon que la lésion spinale est complète ou incomplète.

Une lésion au niveau thoracique entraînera des perturbations au niveau de la partie inférieure du corps. Les capacités locomotrices de ces patients paraplégiques sont diminuées ou même abolies dans le cas de lésions complètes et les obligent à se déplacer surtout en chaise roulante.

### Recherches sur les lésions de la moelle épinière

Plusieurs approches de recherche sont adoptées pour tenter de pallier à ces déficits et promouvoir la récupération des habiletés locomotrices des patients. Notamment,

---

<sup>1</sup> National Spinal Cord Injury Association of Canada, 2005



le champs de recherche visant la repousse axonale est en effervescence et donne des signes encourageants grâce à certaines cellules et molécules (anti-Nogo, cellules engainantes du nerf olfactif, cellules de Schwann, etc.) favorisant la croissance axonale à travers le site de lésion (Tuszynski et Gage, 1995; Schwab, 2004; Bunge et Pearse, 2003). De même l'implantation de greffes de cellules embryonnaires ou de nerfs périphériques sur des modèles animaux semble donner des résultats prometteurs (Ribotta et al., 2000).

D'autres approches visent à tirer profit de la plasticité des réseaux médullaires localisés sous la lésion. En effet, des études pionnières du début du 20<sup>e</sup> siècle ont mis en évidence un réseau de neurones évoquant le patron locomoteur des membres postérieurs chez le chat et le chien (Philippson, 1905; Sherrington, 1910a; Roaf et Sherrington, 1910; Brown, 1911). L'existence de ce réseau locomoteur appelé générateur central de patron locomoteur (ou CPG en anglais) a été démontrée chez plusieurs espèces animales ainsi que chez l'humain (Dimitrijevic et al., 1998; Yang et al., 1998; Dietz et Harkema, 2004). Normalement, le réseau locomoteur est activé et modulé par les signaux provenant des centres supraspinaux, et il s'adapte à l'environnement par les signaux des afférences sensorielles provenant des membres. Suite à une lésion spinale complète de la moelle épinière au niveau thoracique, le CPG des membres postérieurs n'est plus sous contrôle volontaire mais reçoit encore les influx des afférences périphériques.

Comment peut-on réactiver ce circuit? Différentes techniques sont utilisées avec un certain succès, pour tenter d'activer le réseau locomoteur spinal tel que l'entraînement locomoteur sur tapis roulant et l'administration d'agents pharmacologiques (Barbeau et Rossignol, 1987; Chau et al., 1998a; Forssberg et Grillner, 1973). Plus récemment, la stimulation électrique de la moelle épinière a aussi été utilisée pour permettre la récupération de mouvements locomoteurs après une lésion spinale (Dimitrijevic et al., 1998; Shapkova et Schomburg, 2001; Herman et al., 2002). Cette dernière approche a fait l'objet des recherches effectuées au cours de mon doctorat en utilisant le chat spinal comme modèle expérimental.

Aussi, l'objectif à long terme serait de pouvoir évoquer une activité locomotrice des membres postérieurs qui serait coordonnée à l'activité des membres antérieurs. Par exemple, on pourrait capter un signal d'une voie supraspinale interrompue ou de l'activité électromyographique d'un muscle de la patte antérieure pour synchroniser la locomotion

des membres postérieurs. En ce sens, les recherches menées au cours de ce travail de thèse constituent une étape importante vers cet objectif.

Lorsque nous avons entamé ces travaux, bien peu de données étaient disponibles sur la possibilité d'évoquer la locomotion par la stimulation intraspinale et plusieurs questions se posaient quant à la marche à suivre. Comment et où stimuler ? Une seule électrode de stimulation est-elle suffisante ? Nous avons donc testé différents paramètres de stimulation pour déclencher la locomotion en variant l'intensité, la fréquence et les caractéristiques de l'impulsion électrique ou du train de stimulation envoyé. La localisation optimale pour induire la locomotion n'étant pas connue non plus, nous avons appliqué la stimulation électrique à différents niveaux, différentes latéralités et différentes profondeurs de la moelle épinière. Ainsi nous avons pu établir la distribution des réponses locomotrices mais également des différentes réponses motrices ipsilatérales et bilatérales des membres postérieurs induites par la stimulation. Cette cartographie a été faite pour des chats spinaux d'une semaine non-entraînés et des chats spinaux de 3 à 5 semaines entraînés à marcher sur le tapis roulant, pour déterminer le degré de plasticité de cette distribution. Les résultats de ces travaux sont inclus dans le second chapitre. Puis, nous avons analysé les caractéristiques de la locomotion et déterminé les mécanismes importants pour son induction. Notamment, plusieurs études suggèrent que les segments lombaires moyens L3-L4 sont essentiels pour l'expression d'une locomotion spinale (Langlet et al., 2005) (Leblond et al., 2001; Marcoux and Rossignol 2000). Nous avons donc tenté de déterminer l'importance de ces segments dans la genèse de la locomotion évoquée par stimulation électrique. Ces résultats, ainsi que les paramètres optimaux de stimulation sont compris dans le troisième chapitre de cette thèse.

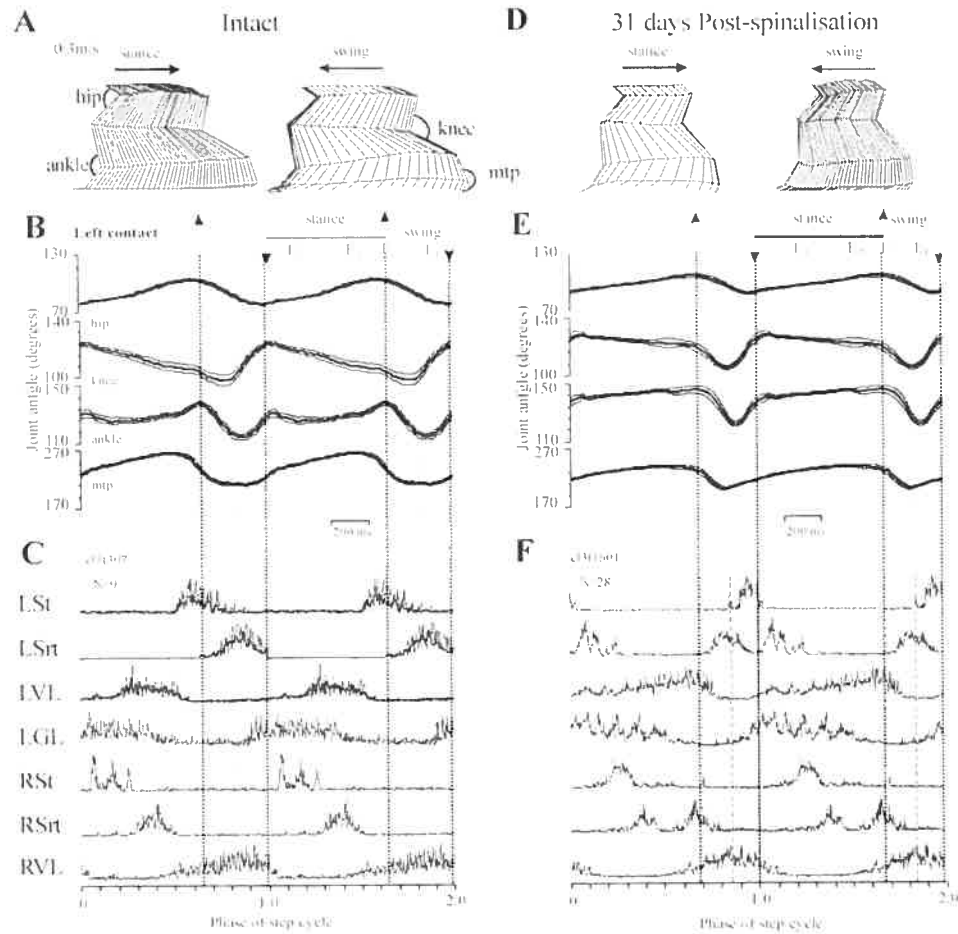
Pour mettre en contexte les divers aspects de ce travail, les patrons locomoteurs normal et spinal seront décrits dans un premier temps. Puis l'accent sera mis sur les mécanismes spinaux qui sous-tendent la locomotion ainsi que l'influence des voies supraspinales et sensorielles. Je discuterai aussi des changements sous-jacents à la récupération locomotrice des animaux spinaux et de l'utilisation de la stimulation électrique pour induire la locomotion dans différentes préparations, incluant l'humain. Finalement, j'exposerai ma problématique de recherche.

## Patron cinématique de la locomotion

La compréhension du patron cinématique et électromyographique (EMG) de la locomotion est essentielle à cette thèse, car ils constituent les données de base de mes expériences. Leur analyse nous permet de déterminer la présence d'activité locomotrice et aussi d'apprécier la qualité de la locomotion induite par la stimulation électrique.

Aussi, plus qu'une simple alternance entre flexion et extension des articulations, la locomotion consiste en un patron d'activation élaboré et spécifique de différents muscles des membres (Rossignol, 1996). Un modèle de patron cinématique de la marche chez le chat intact est présenté dans la Figure 1 (A,B,C). Déjà en 1905, les travaux de Philippon, sur la patte postérieure du chien, ont défini le cycle de marche comme l'intervalle de temps entre deux contacts au sol successifs de la même patte et l'alternance entre 2 phases, soit la phase de support (stance), lorsque le pied est en contact avec le sol, et celle de balancement (swing), lorsque le pied perd contact avec le sol (Philippon, 1905). Chacune de ces phases est subdivisée en 2 parties, selon les mouvements qui se produisent au niveau de la cheville et du genou. La première phase du balancement consiste en une flexion de la hanche, du genou et de la cheville et constitue la phase dite de flexion (F). Vers la moitié du balancement, alors que la hanche continue de fléchir, le genou et la cheville entament une extension qui leur permet d'amener le pied au sol. C'est la première phase d'extension (E1). Ces extensions actives du genou et de la cheville anticipent le contact au sol et l'acceptation du poids du corps. Le contact du pied au sol marque le début de la phase d'appui : le genou et la cheville fléchissent passivement pendant l'acceptation du poids par la jambe (yield) et ceci même si les muscles extenseurs sont fortement contractés.

Cette deuxième phase d'extension constitue la phase E2 et elle permet au corps de se mouvoir vers l'avant avec un point d'appui au sol. Vers la fin de la phase d'appui (phase E3 ou push off), la hanche, le genou et la cheville font une extension et les muscles extenseurs se contractent pour propulser le corps vers l'avant. Ce patron cinématique de base est fixe et ne dépend pas de la vitesse de la locomotion (Shik et Orlovsky, 1976).



**Figure 1. Comparaison de la locomotion avant et après spinalisation chez le même chat à 0.4 m/s**

A et D, Diagramme du mouvement effectué par la patte postérieure du chat, reconstruite à partir de séquences vidéo d'un cycle de marche normal, montrant la phase de balancement et la phase d'appui séparément. Les flèches au-dessus de ces diagrammes pointent vers la direction du mouvement de la jambe. L'orientation des angles est donnée pour chaque articulation. B et E. Excursion angulaire des 4 articulations du membre postérieur représentant une moyenne des cycles. La première ligne pointillée représente le début de la flexion du genou et détermine le début de la phase de balancement. La zone ombragée représente la durée de la phase de balancement comprenant les sous-phases F et E1. La deuxième ligne pointillée représente le contact de la patte sur le tapis roulant et détermine le début de la phase d'appui. Tous les angles et les enregistrements EMG dessous sont synchronisés sur ce contact du pied. C et F. Enregistrements EMG moyennés et rectifiés et synchronisés sur le contact du pied ipsilatéral. Les données sont présentées pour un chat intact (A-C), puis spinalisé à T13, 31 jours auparavant et qui a récupéré la locomotion sur tapis roulant.

Reproduit de Rossignol 2004

Cependant, d'autres paramètres de ce cycle, notamment la durée de certaines phases ainsi que l'amplitude de l'excursion angulaire des articulations, peuvent varier en changeant la force propulsive développée par les membres ou encore la fréquence de locomotion (Rossignol, 1996). Dans ce dernier cas, la durée de la phase d'appui est inversement proportionnelle à la vitesse de locomotion, alors que la durée de la phase de balancement change très peu (Shik et Orlovsky, 1976; Halbertsma, 1983). Le type de locomotion peut aussi être différent selon la vitesse. À basse vitesse, la marche consiste en une alternance entre le contact des 4 membres au sol et celle où 3 membres sont sur le sol. Le trot survient à vitesse plus élevée lorsque les 2 membres en diagonal sont en contact avec le sol pour l'appui et où les 4 membres ne touchent plus au sol pour le balancement. À vitesse très élevée, le chat passera au galop qui consiste à bouger en phase les 2 membres de chacune des ceintures scapulaire et pelvienne (Rossignol, 1996; Goslow et al., 1973). Bien que le patron intrinsèque du rythme locomoteur soit d'origine spinale, la force déployée par les muscles ainsi que la fréquence de la locomotion sont grandement influencées par les voies supraspinales et les afférences sensorielles qui seront décrites dans une section subséquente.

### **Patron électromyographique de la locomotion**

Le patron de base de l'activité électromyographique (EMG) au cours de la locomotion comprend l'activation de nombreux muscles (voir Figure 1). En général, la contraction des muscles fléchisseurs survient pendant la phase de flexion (F) et aussi pendant la première phase d'extension (E1) pour la hanche, alors que la contraction des muscles extenseurs a lieu pendant l'une ou plusieurs des phases d'extension (E1, 2 ou 3). Dans cette description, nous nous concentrerons sur les muscles que nous enregistrerons dans les membres postérieurs au cours de notre travail.

## **EMG au cours de la phase d'appui**

Lors de la phase d'appui, les muscles extenseurs ont un patron d'activité similaires les uns aux autres (Pratt et Loeb, 1991; Rasmussen et al., 1978). Ils sont activés entre 20 et 80 ms avant que la patte ne touche le sol (Halbertsma, 1983), et donc leur décharge ne semble pas être déclenchée par des afférences sensorielles associées au contact (Engberg et Lundberg, 1969). Cette hypothèse a été vérifiée par des expériences menées sur des chats intacts (Gorassini et al., 1994). Ces chats marchaient sur une passerelle munie d'une trappe qui pouvait s'ouvrir inopinément, empêchant le contact du pied sur le sol. En comparant les cycles locomoteurs avec contact sur le sol et ceux dans lesquels la trappe s'est ouverte, ils ont observé que la bouffée initiale EMG des extenseurs était toujours présente. Donc, le profil de base d'activation des muscles extenseurs semble être généré centralement dans cette partie du cycle.

Quant au dérours temporel de décharge EMG, il diffère entre les extenseurs. L'extenseur du genou Vastus Lateralis (VL) est graduellement recruté à partir de E1 et atteint son maximum à E3, alors que les extenseurs de la cheville Gastrocnemius Médialis et Latéralis (GM et GL) ont généralement une initiation plus abrupte et atteignent leur maximum à la phase E2 pendant leur phase d'allongement (Gorassini et al., 1994; Walmsley et al., 1978; Whiting et al., 1984). Le Soleus, extenseur de la cheville et synergiste des Gastrocnemii, est recruté à son maximum lors de la locomotion à basse vitesse dû à sa forte composition en fibres lentes (Walmsley et al., 1978). Les muscles extenseurs agissant à la cheville et aux orteils ont un rôle important dans le positionnement et la stabilisation du pied.

De plus, les muscles actifs pendant cette phase ne regroupent pas seulement des extenseurs purs mais incluent aussi d'autres groupes fonctionnels tels les adducteurs, qui contrôlent le mouvement médiolatéral du membre en même temps que l'extension (Shik et Orlovsky, 1976).

## **EMG au cours de la phase de balancement**

Pendant la phase de balancement, le patron de décharge des muscles fléchisseurs, principalement les muscles biarticulaires, est plus complexe. Le fléchisseur de la hanche Iliopsoas (Ip) décharge continuellement pendant la phase F et E1. Le Sartorius (Srt) possède 2 portions anatomiquement distinctes soit la partie antérieure qui fléchit la hanche et permet l'extension du genou et la partie médiane qui fléchit la hanche et le genou. Certaines études rapportent une seule bouffée EMG du sartorius commençant avant la phase E3, mais d'autres décrivent une 2<sup>e</sup> bouffée dans la portion antérieure du sartorius pendant l'appui (Halbertsma, 1983; Hoffer et al., 1987), sans doute en lien avec sa fonction d'extenseur du genou. Le Semitendinosus (St), fléchisseur du genou et extenseur de la hanche, décharge vers la fin de la phase E3 et est impliqué dans la première partie de la phase de balancement permettant la levée du pied. St a une 2<sup>e</sup> bouffée variable dans E1, juste avant le contact au sol qui est plus consistante à haute vitesse (Engberg et Lundberg, 1969; English et Weeks, 1987; Perret et Cabelguen, 1976; Pratt et al., 1991; Rasmussen et al., 1978; Smith et al., 1993). Le Tibialis Antérieur (TA), fléchisseur de la cheville, est actif pendant la phase de balancement (F).

Le patron de décharge des muscles peut varier selon les conditions dans lesquelles l'animal est testé. Par exemple des différences dans le patron musculaire ont été observées selon que le chat marche sur un terrain plat, une pente inclinée montante ou une pente inclinée descendante (Smith et al., 1998; Carlson-Kuhta et al., 1998; Matsuyama et Drew, 2000).

La séquence d'activation musculaire décrite souligne la complexité des mécanismes impliqués dans la genèse de la locomotion chez le chat intact. Ces mécanismes intraspinaux sont activés et modulés par les voies descendantes et ils sont également influencés par les informations sensorielles en provenance des afférences périphériques des membres.

*Cette description de la locomotion donne les balises pour caractériser les réponses que nous allons observer suite aux stimulations électriques intraspinales que nous allons effectuer. En effet, les 4 phases du cycle de marche et l'alternance observée entre les muscles antagonistes seront les critères que nous utiliserons pour déterminer si l'activité évoquée par la stimulation spinale est de type locomoteur ou non.*

## Générateur spinal du patron locomoteur

Après une lésion complète de la moelle épinière au niveau thoracique (T13) interrompant les signaux des voies descendantes, une activité locomotrice est possible grâce aux réseaux d'interneurones spinaux qui constituent le générateur central de patron locomoteur.

### Évidences d'un réseau locomoteur spinal

Déjà au début du 20<sup>e</sup> siècle, Sherrington (Sherrington, 1910a; Sherrington, 1910b) a montré que les structures supraspinales ne sont pas essentielles à l'activation d'un patron locomoteur car des chats spinalisés au niveau thoracique bas pouvaient récupérer la marche. Graham Brown (1911) a de plus démontré que la moelle épinière pouvait évoquer un patron locomoteur de base en l'absence d'afférences sensorielles, même si ces dernières modulent fortement la locomotion.

Le réseau locomoteur mis en évidence par ces études pionnières est présent dans la moelle épinière à la naissance. En effet, des chats spinalisés (T13) quelques jours après la naissance peuvent exprimer un patron locomoteur complet suite à un entraînement sur tapis roulant (Forssberg et al., 1980a; Forssberg et al., 1980b; Grillner, 1981). La cinématique et les EMGs de ces chats sont très similaires à ceux des chats non-lésés et ils peuvent adapter leur locomotion aux différentes vitesses du tapis roulant, même à des vitesses asymétriques d'un tapis roulant à deux courroies. Cependant, l'âge du chat lors de la spinalisation serait déterminant car les animaux spinalisés à 2 semaines démontrent une meilleure locomotion que ceux spinalisés à 12 semaines (Bregman et Goldberger, 1983; Robinson et Goldberger, 1986; Smith et al., 1982).

À l'âge adulte, les chats spinaux aigus (T13), c'est-à-dire spinalisés moins de 24 heures avant l'expérience, peuvent marcher avec leurs membres postérieurs sur un tapis roulant lorsqu'un agoniste noradrénergique alpha-2, la clonidine, leur est injecté (Forssberg et Grillner, 1973). Les évidences quant à l'existence d'un réseau locomoteur spinal ont aussi été obtenues chez plusieurs autres espèces animales incluant la souris (Leblond et Rossignol, 2003), le rat (Cazalets et al, 1992,1995; Cowley and Schmidt, 1997) et le



primate non-humain, le marmouset (Fedirchuk et al., 1998). De même, de récentes études suggèrent l'existence d'un tel réseau chez l'humain (Calancie et al., 1994; Dietz et al., 1995; Harkema et al., 1997; Dimitrijevic et al., 1998). Ainsi, la moelle épinière comprend un réseau neuronal autonome, capable de générer un patron locomoteur, même en l'absence des voies supraspinales. Toutefois, on pourrait se demander si cette locomotion est similaire à celle observée chez le chat intact.

### **Locomotion spinale chez le chat**

Les travaux de différents laboratoires dont celui du Dr Rossignol ont clairement établi que la qualité de la locomotion des chats spinaux s'améliore avec l'entraînement et que le patron locomoteur spinal évolue avec le temps (Barbeau et Rossignol, 1987; Bélanger et al., 1996; Rossignol et al., 1982; Rossignol et al., 1986). Immédiatement après une lésion complète au niveau de la 13<sup>e</sup> vertèbre thoracique, les réflexes spinaux sous le niveau de la lésion sont réduits voire complètement abolis. Cette période de choc spinal serait due au retrait soudain de l'influence tonique facilitatrice des voies descendantes. Le choc spinal dure plusieurs jours voire plusieurs semaines chez l'humain (Leis et al., 1996), mais seulement quelques heures chez le chat (Iwahara et al., 1991b). Cette différence reflèterait la plus grande influence des afférences descendantes sur les circuits spinaux chez l'humain.

La réexpression de la locomotion chez le chat spinal se fait progressivement. Au cours des premières 24 à 48 heures suivant cette période, le chat ne peut marcher sur tapis roulant, ni supporter son poids. Avec une forte stimulation périnéale ou abdominale, les membres postérieurs produisent une extension et quelques pas peuvent être observés. Dans les jours suivants, un entraînement quotidien sur tapis roulant avec stimulation périnéale à raison de plusieurs fois par jour est entrepris. Vers le 5<sup>e</sup> jour, les chats peuvent effectuer des mouvements locomoteurs restreints même si les membres postérieurs demeurent en extension. De plus, les chats traînent la patte pendant presque toute la phase de balancement et le contact du pied se fait avec le bout ou sur la face dorsale des orteils. En général, aucun support de poids n'est détecté à ce stade. Vers le 10<sup>e</sup> jour post-spinalisation, les chats commencent à supporter leur poids et posent leur pied plus fréquemment sur la face plantaire à la fin de la phase de balancement. L'extension de la patte à la fin de la phase

d'appui est augmentée, ce qui allonge le pas. Après 3 à 4 semaines, ils effectuent un contact plantaire en avant de l'axe vertical passant par la hanche à la fin du balancement, ce qui augmente aussi la longueur du pas. Ils peuvent supporter leur poids et la locomotion peut être déclenchée uniquement par le mouvement du tapis roulant, sans stimulation périnéale (Figure 1D, E, F). Il est à noter que même si la fréquence de marche et la qualité de la locomotion spinale varient d'un chat à l'autre, presque tous les chats spinaux récupèrent la locomotion lorsqu'ils sont spinalisés à T13 (Rossignol et al., 2000). Cependant, la coordination entre les membres antérieurs et postérieurs n'est plus possible et leur équilibre pendant la locomotion quadrupède est précaire voire impossible (Eidelberg et al., 1980; Grillner, 1981; Rossignol, 1996).

Après récupération complète de la locomotion, une comparaison des enregistrements EMG et cinématiques pré- et post- spinalisation chez un même chat montre de grandes similarités (Bélanger et al., 1996; Rossignol, 2000) (Figure 1). En général, les chats récupèrent un bon contact plantaire avec le sol lors de la phase d'appui et peuvent supporter leur poids, mais plusieurs chats continuent de traîner la patte au début de la phase de balancement. La longueur du pas est diminuée chez les chats spinaux et l'excursion angulaire de la hanche peut aussi être diminuée. Ces observations sont constantes jusqu'au 3<sup>e</sup> mois après la spinalisation, étape à laquelle la majorité des paramètres de la locomotion sont stabilisés. L'analyse des EMGs révèle une période de co-contraction entre des muscles antagonistes d'une même articulation, notamment entre les muscles Srt et VL (c.f. Figure 1). De plus, la contraction du Soleus et du Gastrocnemius Medialis des chats spinaux atteint le même niveau de force que celui d'un chat normal, et serait assez grand pour participer à la propulsion (Forssberg et al. 1980b), bien que la force déployée diminue plus rapidement pendant la phase d'appui (Lovely et al., 1990). En définitive, l'entraînement locomoteur régulier et quotidien est efficace pour faciliter la récupération de la locomotion d'un chat spinal, et ce même s'il commence un mois après la spinalisation (Edgerton et al., 1991; Edgerton et al., 1992; Lovely et al., 1986; Lovely et al., 1990).

*Ainsi, le rythme locomoteur de base est généré au niveau de la moelle épinière. Le patron locomoteur spinal est semblable à celui observé chez le chat intact et confirme les caractéristiques importantes pour déterminer si la stimulation électrique peut activer ou non des séquences locomotrices.*

## **Hypothèse sur le réseau locomoteur spinal**

Le but de nos travaux est d'activer le générateur spinal du patron locomoteur avec la stimulation électrique intraspinale. Cependant, l'organisation exacte de ce générateur n'est toujours pas bien comprise et plusieurs théories ont tenté d'en expliquer les mécanismes intrinsèques.

Une des premières hypothèses expliquant la capacité de la moelle épinière à générer la locomotion est celle de la chaîne de réflexes (Sherrington, 1910a)(Gray et Lissmann, 1946a; Gray et Lissmann, 1946b; Lissmann, 1946) Selon cette hypothèse, les mécanismes spinaux contrôlant la locomotion dépendraient essentiellement des afférences périphériques des membres en mouvement. Ainsi, un input sensoriel déclencherait la contraction d'un groupe musculaire. Cette contraction résulterait en un signal proprioceptif provoquant la contraction d'un autre groupe musculaire et ainsi de suite jusqu'à l'obtention du cycle locomoteur complet (Shik et Orlovsky, 1976).

### Théorie des demi-centres

Contrairement à la théorie de la chaîne de réflexes de Sherrington où la locomotion n'est qu'un enchaînement de réflexes, les expériences de Brown (1911) ont démontré que l'alternance entre des muscles antagonistes peut être observée en absence d'afférences sensorielles. Il a ainsi proposé que la contraction des muscles fléchisseurs et extenseurs serait contrôlée par 2 systèmes de neurones qu'il a nommés demi-centres, et qui s'inhiberaient mutuellement. L'alternance entre l'activité de ces demi-centres serait causée par la 'fatigue' des connections inhibitrices.

Dans les années 60, des expériences sur des chats spinaux curarisés ayant reçu un précurseur de la noradrénaline ont appuyé cette théorie (Jankowska et al., 1967a; Jankowska et al., 1967b). En effet, suite à l'administration de L-dihydroxyphenylalanine (L-DOPA), un précurseur des neurotransmetteurs monoaminergiques, une brève stimulation électrique des afférences de réflexe de flexion (FRA) induit des bouffées de longue latence et de longue durée dans les fléchisseurs ipsilatéraux mais inhibent le extenseurs. Les interneurons générant les bouffées de flexion inhibaient le groupe d'interneurones générant les bouffées d'extension et vice-versa. Ainsi, chacun de ces groupes d'interneurones pourrait représenter un demi-centre. Ces interneurons feront

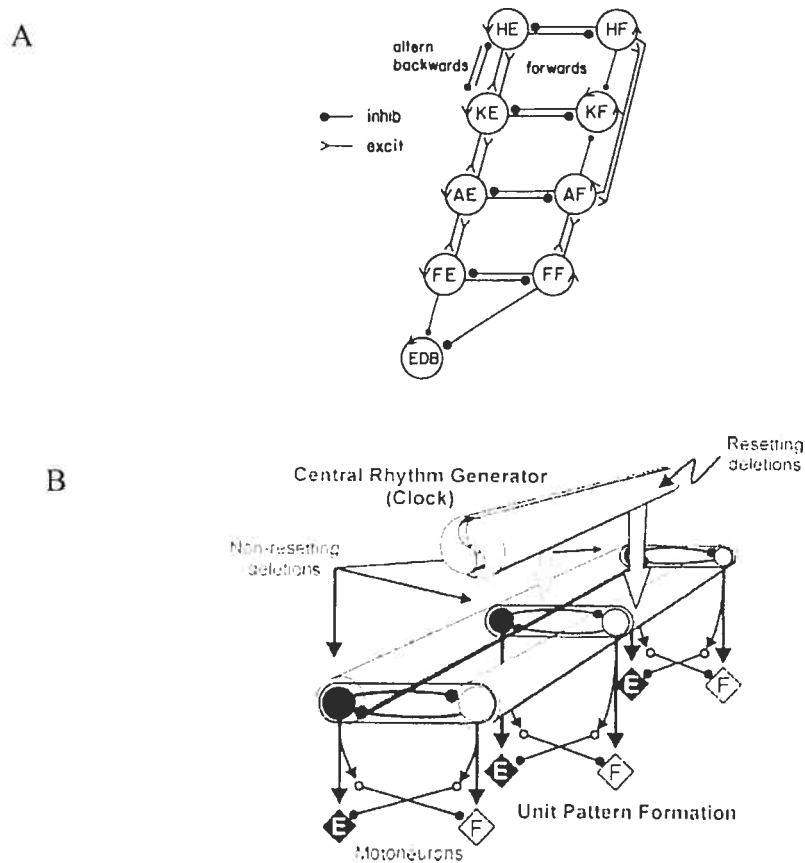
l'objet d'une description plus détaillée dans la section 'interneurones FRA' de cette introduction.

Selon cette théorie, la moelle épinière générerait un rythme simple et alterné de flexion et d'extension grossières dans les muscles fléchisseurs et extenseurs d'un membre qui serait façonné par les afférences périphériques (Brown, 1914 ; Engberg et Lundberg 1969). Cependant, la déafférentation des chats décérébrés, bien qu'elle ne soit pas sans effets sur la robustesse du patron locomoteur, ne réduit pas le complexe patron d'activité EMG à une simple alternance entre la flexion et l'extension. De plus, des épisodes de locomotion spontanée ayant un patron complexe similaire à celui du chat intact peuvent être enregistrés dans les nerfs périphériques des membres postérieurs de chats spinaux curarisés (Grillner et Zangger, 1979). Ces expériences démontrent que les mécanismes centraux peuvent induire un patron musculaire complexe et détaillé au cours de la locomotion, même en absence d'inputs sensoriels reliés au mouvement, rejetant du même coup cette hypothèse.

### Générateur à unité rythmique

La théorie du CPG tel que décrite par Grillner (1981), suggère un fonctionnement plus modulaire de ce réseau spinal (Figure 2A). Selon ce modèle, il y aurait un réseau locomoteur pour chaque membre, et celui-ci serait subdivisé en unités distinctes appelées 'unités génératrices de rythme'. Chaque unité produirait une activité rythmique par elle-même et assurerait l'alternance des muscles fléchisseurs et extenseurs au niveau d'une articulation donnée. Le patron locomoteur final résulterait d'une activité combinée de ces différentes unités qui sont interconnectées.

L'avantage d'une telle organisation est qu'elle est versatile et permet différents types de modification du patron locomoteur, ce qui permettrait d'expliquer plusieurs phénomènes observés chez l'animal. Entre autres, l'activité rythmique d'un groupe de muscles peut cesser malgré une rythmicité continue dans d'autres groupes de motoneurones. D'après la présente hypothèse, ce phénomène serait expliqué par le fait qu'un groupe musculaire serait fonctionnellement déconnecté des autres. Ceci ne pourrait pas se produire si le générateur entier n'était constitué que d'un seul module alternant entre la flexion et l'extension de tout le membre (Grillner, 1981).



**Figure 2. Générateur de patron central**

A. Schéma de la théorie de patron central (CPG) décrit par Grillner (1981). Le générateur d'un membre consisterait en une mosaïque de plusieurs unités génératrices de bouffées rythmique. Chaque unité par elle-même peut produire un rythme. Les connections entre ces unités déterminent la phase d'activité des différents groupes musculaires, notamment au cours de la locomotion (Reproduit de Grillner, 1981).

B. Schéma représentant l'architecture proposée du CPG qui comprendrait un seul module générateur de rythmes et plusieurs modules générateurs de patron. (Reproduit de Lafreniere-Roula et McCrea, 2005)

E, extensor; F, flexor; H, hip; K, knee; A, ankle; FE, foot extensor; FF, foot flexor; EDB, extensor digitorum brevis

### Générateurs de patron musculaire et de rythme locomoteur

Récemment, le laboratoire du Dr McCrea a abordé la problématique du fonctionnement intrinsèque du réseau locomoteur spinal en analysant des phénomènes d'absence (délétion) spontanée de bouffées rythmiques motoneuronales au cours d'une séquence de locomotion fictive chez le chat adulte décérébré (Lafreniere-Roula et McCrea, 2005). Ils ont observé que les absences de bouffées rythmiques pouvaient survenir dans les fléchisseurs comme dans les extenseurs du membre postérieur et les enregistrements intracellulaires montraient une corrélation entre ces absences et une diminution d'activité dans les motoneurones homonymes. L'activité rythmique qui suit cette absence reprend à un temps  $t$ , qui est un multiple de la période du cycle préexistant. De plus, l'activité rythmique des motoneurones antagonistes est habituellement conservée pendant les délétions sans changement au niveau du rythme. Basé sur ces évidences, les auteurs suggèrent que le générateur de patron locomoteur serait en fait bipartite et comprendrait un seul module générateur de rythme et plusieurs modules générateurs de patron (Figure 2B). Ces derniers contrôlèrent l'hyperpolarisation ainsi que la dépolarisation de sous-groupes de motoneurones de façon similaire à ce qui a été décrit par Grillner (1981).

Cette théorie recoupe celles qui avaient été avancées par Burke (2001) et par Lennard (1985). Cette dernière propose l'existence de 2 populations distinctes d'interneurones contrôlant respectivement le patron musculaire et le rythme de marche. Cette théorie permettrait aussi d'expliquer les effets de différentes structures supraspinales et de certaines afférences sensorielles sur le patron et/ou le rythme de la locomotion (Armstrong, 1986; Rossignol et al., 2006), selon la partie du générateur auquel ces voies ont accès. En effet, certaines voies auraient accès au générateur de rythme ainsi qu'au générateur de patron et pourraient réinitialiser la locomotion, alors que d'autres n'auraient accès qu'aux générateurs de patron et ne pourraient modifier que l'output moteur (Rho et al., 1999).

*La conception du générateur central de patron locomoteur progresse et évolue. Il est tout à fait raisonnable de penser qu'avec une stimulation électrique il serait possible d'activer directement le CPG, de déclencher la locomotion et peut-être aussi de modifier la durée du cycle de marche. Si tel était le cas, on pourrait coupler l'activité du générateur lombaire au signal d'un muscle des membres antérieurs et ainsi coordonner*

*l'activité des 2 ceintures. Cependant, il nous faut connaître davantage la localisation des éléments constituant le générateur lombaire, et le présent travail tente de répondre à cette question.*

## **Localisation des éléments du générateur de patron locomoteur**

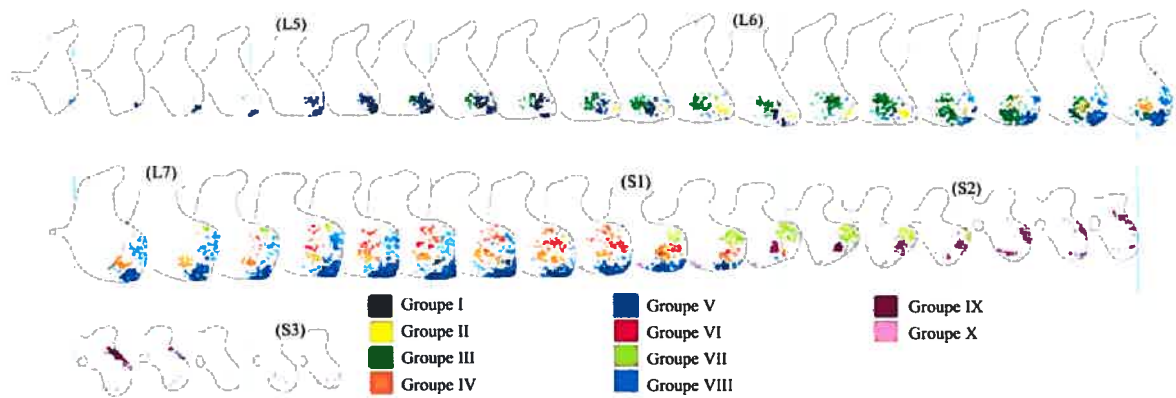
### **Importance des segments lombaires moyens (L3-L4) chez le chat**

Chez le chat, les segments lombaires L3 et L4, qui sont rostraux aux principaux groupes de motoneurones innervant le membre postérieur (Figure 3), seraient impliqués de manière prépondérante dans l'initiation de la locomotion spinale. Cette hypothèse a pris naissance au cours d'expériences où de petites doses de clonidine étaient administrées via une cannule intrathécale (Chau et al., 1998b; Rossignol et al., 2004). Ces injections étaient très efficaces pour initier la locomotion et une vérification de la localisation de la canule post-mortem a révélé que la diffusion du bolus de clonidine était restreinte à une poche de tissu fibrosé sur la surface de la moelle épinière, au niveau des segments L3-L4.

Suite à ces observations, Marcoux et Rossignol (2000) ont démontré que des microinjections intraspinales de clonidine au niveau des segments L3 ou L4 peuvent déclencher la locomotion des membres postérieurs chez un chat spinalisé à T13 une semaine auparavant, et décérébré le jour de l'expérience. Dans la même préparation et suite à l'induction de la locomotion par injection intraveineuse (i.v.) de clonidine, des microinjections de yohimbine (antagoniste noradrénergique alpha-2) localisées au niveau L3, L4 ou L5 bloquent le rythme locomoteur. De plus, une deuxième spinalisation effectuée au niveau de L4, région rostrale aux principaux noyaux moteurs du membre postérieur (Vanderhorst et Holstege, 1997), abolit toute locomotion. Les résultats de ces expériences ont aussi été reproduits en locomotion fictive (Leblond et al., 2001).

Une évaluation de l'importance de ces segments rostraux a aussi été entreprise sur des chats spinaux chroniques (Langlet et al., 2005). Après la première lésion à T13, tous les

effectuée au niveau de L2 ou de rostral L3 ne bloque pas l'expression d'un patron locomoteur complet qui peut être réexprimé dès le lendemain de la spinalisation.



**Figure 3. Localisation des groupes de motoneurones innervant les muscles des membres postérieurs dans le renflement lombosacré**

Les motoneurones marqués le plus rostralement (L5 et un peu avant L5) innervent principalement les muscle ilio-psoas et sartorius (groupe I). Les motoneurones innervant les muscles de la patte postérieure plus distaux ainsi que les extenseurs sont localisés progressivement plus caudalement dans les segments L5 à S1. Groupe II :quadriceps, Groupe III :Adducteurs, Groupe IV :Ischio-Jambiers, Groupe V :Gluteus et autres muscles proximaux de la hanche, Groupe VI :muscles de la loge postérieure de la jambe, Groupe VII :Longs gléchisseurs et muscles intrinsèques du pied, Groupe VIII : muscles de la loge antérieure de la jambe, Groupe IX : muscles du plancher pelvien et de la vessie, Groupe X : Muscles innervant les extenseurs du bas du dos et la partie proximale de la queue (Reproduit de Vanderhorst et Holstege, 1997).



Cependant, une lésion effectuée au niveau caudal L3 ou à L4 abolit la locomotion et le chat ne peut récupérer la marche sur tapis roulant malgré un entraînement locomoteur intensif de plusieurs semaines. L'injection de clonidine n'induit pas la locomotion après cette deuxième lésion mais produit plutôt une hyperextension tonique des membres postérieurs. Cependant, une vigoureuse activité rythmique de secouement de la patte (fast paw shake), est évoquée lorsque le pied est pincé ou trempé dans l'eau, ce qui suggère que les motoneurones localisés caudalement sont toujours fonctionnels. Une séquence de secouement de la patte consiste en une abduction de la hanche suivie de flexion/extension rapide du genou et de la cheville, ces deux articulations n'étant plus couplées (Smith et al 1980 ; Sabin et Smith 1984 ; Smith et al., 1985; Carter et Smith 1986a,b;) . Au niveau de l'activité EMG, ce rythme moteur consiste en une synergie typique de coactivation TA et VL. En conclusion, même si l'activité rythmique du membre est toujours possible (secouement), les segments L3-L4 sont essentiels à l'initiation de la locomotion du chat spinal.

D'autres études chez le chat suggèrent aussi un rôle primordial des segments rostraux dans la locomotion (Baev et Kostyuk, 1982) ainsi que dans un autre patron rythmique spinal, le grattage (scratch) (Deliagina et al., 1983; Kuhta et Smith, 1990). Chez le chat, le grattage consiste en une séquence complexe de mouvements (Deliagina et al., 1975; Berkinblit et al., 1978): 1) la tête est tournée et penchée pour exposer la région irritée ; 2) puis au cours de la première phase de ce mouvement, aussi appelée la phase d'approche, le membre postérieur se positionne en fléchissant la hanche, le genou et la cheville ; 3) ensuite, le genou s'étend pour atteindre l'oreille (pinna) ; 4) le reste du mouvement, la phase de grattage, est constitué de cycles de flexion/extension de 4 à 8 Hz pendant 10 à 15 cycles. Pendant le grattage, le mouvement du genou n'est temporairement plus couplé aux mouvements de la hanche et de la cheville alors que le genou s'étend et la hanche et la cheville demeurent en flexion. Même s'il y a une alternance générale entre les fléchisseurs et les extenseurs, ces derniers sont souvent recrutés séquentiellement : cheville, genou et hanche (voir Deliagina et al., 1975) pour détails. Ce comportement rythmique a été très étudié car certains éléments nerveux du réseau spinal pour cette activité seraient communs au réseau spinal évoquant la locomotion (voir Stein et Smith, 1997). Du fait, les segments lombaires rostraux semblent aussi importants pour le grattage, car l'application

d'une sonde refroidissante au segment L4, bloque le déclenchement du grattage fictif chez un chat paralysé et décérébré.

*En plus de la locomotion, la stimulation électrique pourrait accéder à d'autres réseaux rythmiques dans la moelle épinière et évoquer un mouvement de grattage ou de secouement de la patte. La description des caractéristiques de chacun de ces rythmes (grattage, secouement et locomotion) est donc importante pour déterminer le type d'activité évoqué.*

### **Importance des segments lombaires rostraux chez différentes espèces**

La localisation rostrale des éléments du CPG corroborent des évidences obtenues chez d'autres espèces animales, qui suggèrent aussi un rôle initiateur des segments lombaires rostraux, ou du moins une plus grande excitabilité de ces segments dans des patrons rythmiques. Chez la lamproie, les segments rostraux entraînent les segments plus caudaux pendant la nage vers l'avant. Cette importance des segments rostraux serait due aux différences d'excitabilité segmentaire de même qu'aux voies propriospinales (Cohen et al., 1992; Hagevik et McClellan, 1999; Matsushima et Grillner, 1992; McClellan et Hagevik, 1999; Williams et al., 1990). Les segments entraînant la locomotion chez la lamproie peuvent changer et pendant la locomotion vers l'arrière, les segments caudaux assurent le rôle de meneur.

Chez la tortue ayant subi une lésion caudale au renflement brachial, des études de lésions spinales successives effectuées au niveau du renflement innervant le membre postérieur ont révélé que les segments antérieurs de ce renflement sont nécessaires pour la production du patron moteur de grattage (Mortin et Stein, 1989; Mortin et al., 1985). De même, des expériences menées chez le rat néonatal suggèrent que les segments lombaires rostraux (L1-L2) entraînent les segments caudaux (L3-L5) (Cazalets et al., 1995; Cazalets, 2000) ou du moins sont plus excitables que les segments caudaux lorsqu'ils sont stimulés par des agents pharmacologiques qui induisent la locomotion (Kjaerulff et Kiehn, 1996; Kiehn et Kjaerulff, 1998). Les travaux de Magnuson sur des rats adultes sont particulièrement importants dans ce contexte parce qu'ils montrent que des injections de kainate dans les segments lombaires rostraux, détruisant la matière grise mais laissant intacte la matière blanche, bloquent la locomotion (Magnuson et al., 1999). Aussi chez les rats adultes spinalisés à T8, la greffe de cellules embryonnaires du raphe

(sérotoninergiques) sous le niveau de la lésion induit une récupération locomotrice des membres postérieurs seulement si les fibres sérotoninergiques de la greffe atteignent les segments lombaires rostraux L1-L2 (Gimenez y Ribotta et al., 2000)

*En résumé, les segments lombaires rostraux ou pré-motoneuronaux semblent avoir une importance déterminante dans l'induction de la locomotion chez plusieurs espèces animales. Il sera donc important chez le chat de déterminer l'importance relative des divers segments spinaux dans la production d'une activité locomotrice évoquée par stimulation électrique.*

## Centres supraspinaux

L'étude des mécanismes de la locomotion a permis de comprendre les rôles respectifs des centres supraspinaux, spinaux et des afférences périphériques dans un contexte d'interactions dynamiques (Rossignol et al., 2006). Entre autres, différentes aires du cortex cérébral permettent un contrôle volontaire de la locomotion et l'adaptation de celle-ci à l'environnement à l'aide d'informations visuelles (e.g. obstacles) ou auditifs. Le cervelet joue aussi un rôle important dans la locomotion notamment dans le maintien de l'équilibre et de la coordination locomotrice (Orlovsky et al., 1966; Orlovsky et Pavlova, 1972a). De plus, il contribue au patron de décharge du noyau rouge, des noyaux vestibulaires et de la formation réticulée qui contrôlent directement les paramètres de la locomotion par leur action sur la moelle épinière (Orlovsky, 1970b; Orlovsky, 1972c; Armstrong, 1986). Ainsi, les principales afférences supraspinales, directement impliquées dans la locomotion des membres postérieurs chez l'animal feront l'objet de cette section. Mais d'abord, mentionnons que depuis les années 60, la stimulation électrique est utilisée au niveau du tronc cérébral pour déclencher la locomotion. L'analyse des caractéristiques de ces stimulations pourrait nous guider pour tester différents paramètres de stimulation électrique au niveau de la moelle épinière. De même, les voies d'activation de la locomotion par la stimulation de cette région pourrait pointer vers des interneurons spinaux importants pour le déclenchement de la locomotion.

### **Région locomotrice mésencéphalique**

Sur des préparations de chats et de chiens décérébrés qui ont subi une section du cerveau entre les collicules supérieurs et inférieurs, Sherrington a mis en évidence une aire du tronc cérébral qui évoquait la locomotion lorsque stimulée électriquement (Roaf et Sherrington, 1910; Sherrington, 1910a). Puis, Shik a observé que ce point locomoteur médullaire (locomotor point) tel que nommé par Sherrington ne se limitait pas seulement au tronc cérébral. La stimulation électrique le long d'une mince bande (bande locomotrice ponto-médullaire) s'étendant à travers le tronc cérébral, du mésencéphale à la moelle épinière (et se continuant dans le funicule dorsolatéral jusqu'à L1), pouvait déclencher la locomotion (Shik et al., 1966; Shik et Orlovsky, 1976; Mori et al., 1977; Kazennikov et al., 1983; Shik et Orlovsky, 1976). Plus précisément, la stimulation d'une région restreinte mésencéphalique située ventralement au collicule inférieur et chevauchant une population de neurones cholinergiques dans le noyau pedunculopontique (PPN; Garcia-Rill et Skinner, 1987; Garcia-Rill et al., 1983), à proximité du noyau cunéiforme, est particulièrement efficace. Cette région est très excitable et possède un seuil d'activation très bas pour déclencher la locomotion (Shik et Orlovsky, 1976; Grillner, 1981). La stimulation tonique (50 Hz) à faible intensité de cette région locomotrice mésencéphalique (MLR) induit une marche lente similaire à celle décrite précédemment, avec les bouffées caractéristiques de chaque muscle et leur activation au moment approprié. Des stimulations de plus forte intensité produisent une locomotion plus rapide dont le trot et le galop (Shik et Orlovsky, 1976; Shik et al., 1966). Cette découverte a été déterminante car elle permet d'évoquer fidèlement la locomotion dans une préparation réduite et d'en étudier les mouvements et les mécanismes.

Des études de microinjections de traceurs antérogrades et rétrogrades ont démontré que la MLR activerait les neurones réticulospinaux projetant dans le funicule ventrolatéral et se terminant au niveau lombaire (Steeves et Jordan, 1984; Steeves et Jordan, 1980; Garcia-Rill et Skinner, 1987; Jordan, 1991; Noga et al., 1991). Plusieurs évidences suggèrent ce mécanisme, bien que la stimulation directe de la formation réticulée médiane du tronc cérébral n'induisse pas d'activité locomotrice (Shik, 1983). Un deuxième mécanisme serait l'activation des neurones noradrénergiques du locus coeruleus qui elles projetteraient au niveau de la moelle épinière (Chu et Bloom, 1973; Shik, 1983).

## Systèmes descendants

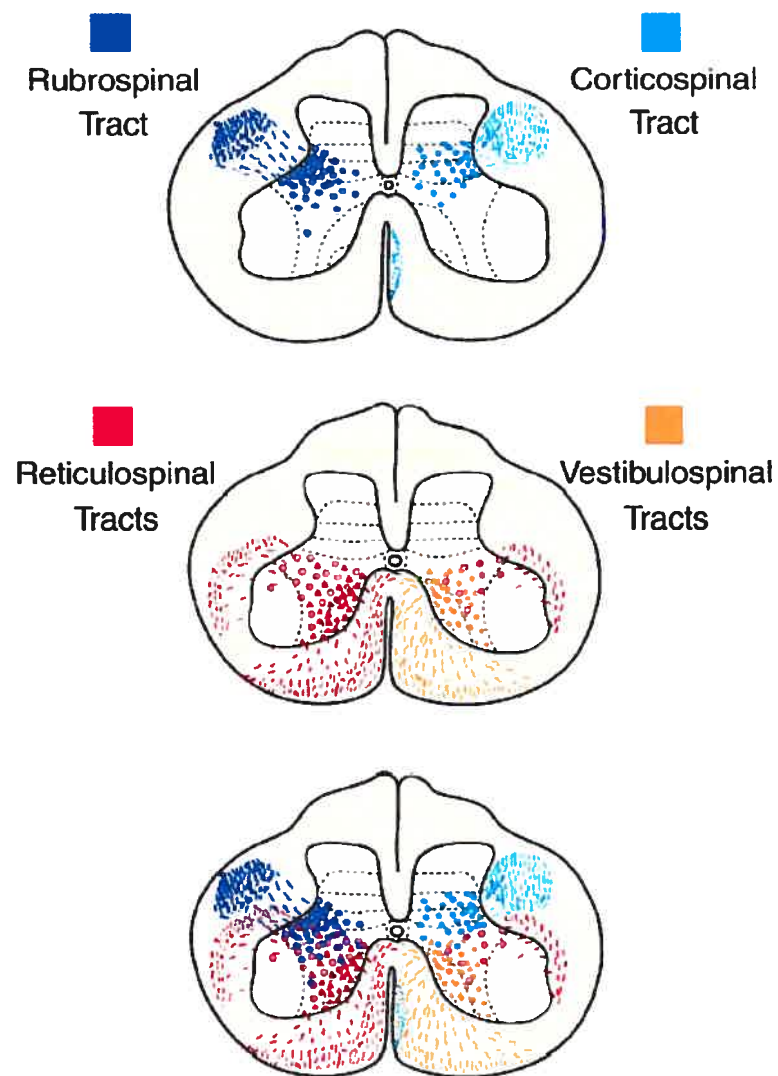
Chez le chat intact, la moelle épinière reçoit des afférences des centres supraspinaux qui la contactent au niveau de régions bien précises. Dans nos expériences, nous allons stimuler la matière grise et la matière blanche de la moelle épinière à différents segments, différentes profondeurs et différentes latéralités. La connaissance de la distribution au niveau spinal de ces voies, ainsi que de leurs effets sur la moelle épinière s'avère donc importante. Les mouvements qui seront induits par la stimulation pourraient être dus à l'activation de la partie distale de ces voies, mais surtout aux interneurones contactés par ces voies. On pourrait s'attendre à ce que la distribution des réponses évoquées par la stimulation électrique reflète, du moins en partie, la distribution des terminaisons de ces différentes voies.

Les centres supraspinaux comprennent plusieurs voies descendantes qui ont été classifiées en 2 grands systèmes, médian et latéral, d'après la distribution anatomique de leur projection et les conséquences des lésions de ces voies chez le chat et le primate (Kuypers, 1964; Kuypers, 1963; Lawrence et Kuypers, 1968b; Lawrence et Kuypers, 1968a). Le premier système serait à la base du contrôle postural et comprendrait les voies vestibulospinales et réticulospinales. Quant au système latéral, il participerait activement au mouvement des membres (par exemple dans les tâches d'atteinte) ainsi qu'au contrôle fin de la locomotion, et comprendrait les voies rubrospinales et corticospinales. Ces 2 systèmes se recoupent jusqu'à un certain point et ne fonctionnent pas indépendamment l'un de l'autre mais plutôt en complémentarité (Drew et al., 2004).

### Système médian

#### *Voie réticulospinale*

Comme dit précédemment, la MLR agirait via la voie réticulospinale pour déclencher la locomotion. Cette voie comprend de longs axones rapides et myélinisés, et pourrait influencer les réseaux locomoteurs spinaux et prendre part dans la coordination entre les membres.



**Figure 4. Distribution des projections supraspinales dans la moelle épinière**

Localisation des faisceaux descendants des voies rubrospinales, réticulospinales, corticospinales et vestibulospinales dans la matière blanche, et distribution des terminaisons de ces voies dans la matière grise de la moelle épinière.

(Reproduit de Brodal, 1981, adapté par Drew 2006)

La voie réticulospinale est plutôt dérivée des cellules de la formation réticulée ponto-médullaire ipsi et controlatérale. Ces cellules projettent dans la colonne ventrale et ventrolatérale et contactent des interneurons dans la partie ventromédiane de la zone intermédiaire de la matière grise ainsi que sur certains motoneurons, principalement des muscles axiaux. La trajectoire spinale et les terminaisons de la voie réticulospinale sont présentées dans la Figure 4, et la localisation des neurones contactés par cette voie sera détaillée dans la section ‘matière grise de la moelle épinière’. La voie réticulospinale a donc une influence directe et indirecte sur les motoneurons innervant les muscles axiaux et proximaux.

Au cours de la locomotion, une majorité de neurones réticulospinaux déchargent rythmiquement, surtout pendant la phase de balancement (Orlovsky, 1972c), bien que Drew et coll. (1986) ont observé deux fois plus de cellules réticulospinales déchargeant en phase avec les muscles extenseurs plutôt qu’avec les muscles fléchisseurs.

La formation réticulée ponto-médullaire contribue de façon importante à la régulation du tonus musculaire pendant la locomotion (Drew et al., 1986; Orlovsky, 1970c; Shimamura et al., 1984). Des études de microstimulation des cellules réticulospinales suggèrent que ces neurones peuvent modifier l’activité des fléchisseurs et des extenseurs selon la phase du cycle locomoteur dans laquelle la stimulation est donnée (Degtyarenko et al., 1993; Drew et Rossignol, 1984; Drew, 1991; Floeter et al., 1993; Orlovsky, 1972c; Perreault et al., 1994). Ainsi, la stimulation de cette région de la formation réticulée produirait un mélange de réponses facilitatrices et inhibitrices dans les muscles extenseurs pendant la phase d’appui et des réponses facilitatrices dans les muscles fléchisseurs pendant la phase de balancement (Degtyarenko et al., 1993; Drew et Rossignol, 1984; Drew, 1991; Orlovsky, 1972c). La stimulation aurait peu d’effet sur la durée du cycle dans un chat intact marchant sur tapis roulant (Rho et al., 1999).

Des enregistrements unitaires de ces neurones ont aussi été effectués au cours de la locomotion fictive spontanée ou induite par stimulation de la MLR, chez des chats décérébrés et curarisés (Perreault et al., 1993). Une majorité de neurones réticulospinaux projetant au renflement lombosacré de la moelle épinière déchargent au début de la locomotion. Ces neurones sont en général modulés rythmiquement pendant la locomotion et serviraient à coordonner l’activité musculaire et ce, même en absence d’input phasique des afférences périphériques.

### *Voie vestibulospinale latérale*

La voie vestibulospinale latérale prend son origine au niveau du noyau vestibulaire latéral (noyau de Deiters) situé dans le tronc cérébral. Les cellules vestibulospinales projettent dans le funicule ventral ipsilatéral et contactent des interneurons dans la partie dorsomédiane de la corne ventrale et la partie médiane adjacente de la zone intermédiaire (Figure 4). Ils terminent aussi sur certains motoneurons, principalement des muscles axiaux, et ont une influence directe et indirecte sur les motoneurons innervant les muscles axiaux et proximaux (Kuypers, 1964).

Au repos, la stimulation de la voie vestibulospinale latérale produit une augmentation de l'activité dans les muscles extenseurs. Au cours de la locomotion, une majorité de neurones vestibulospinaux déchargent rythmiquement, principalement au début de la phase d'appui, avec une action excitatrice sur les motoneurons extenseurs (Orlovsky, 1972c; Shik et Orlovsky, 1976; Matsuyama et Drew 2000b). Une stimulation vestibulospinale pendant la phase de balancement n'a que très peu d'effet (Orlovsky, 1972c). Ainsi, la voie vestibulospinale participerait principalement à réguler le niveau de force développée par les muscles extenseurs, sans action directe sur les caractéristiques temporelles du cycle de marche dans une préparation marchante. En locomotion fictive, où le chat est paralysé et l'activité rythmique enregistré au niveau des nerfs moteurs, la stimulation de cette voie met fin à la phase de balancement et peut réinitialiser le rythme locomoteur en extension (Leblond et al., 2000; Gossard et al., 1996; Russell et Zajac, 1979). Une lésion du noyau vestibulaire (noyau de Deiters) réduirait considérablement ou abolirait les bouffées EMG des muscles extenseurs de la patte ipsilatérale pendant la locomotion des chats décérébrés (Orlovsky, 1972 ; Yu et Eidelberg, 1981). En somme, les voies vestibulo- et réticulospinales passant par les funicules ventraux et ventrolatéraux assureraient le support postural nécessaire à l'expression de la locomotion (Drew et al., 2004).

Des études de lésions ont permis de mieux comprendre le rôle des voies vestibulo- et réticulospinales. Des chats ayant de large lésions des quadrants ventraux et ventrolatéraux, supprimant l'innervation vestibulospinale et une partie de l'innervation réticulospinale, peuvent récupérer la locomotion quadrupède après une longue réadaptation



(Bem et al., 1995; Gorska et al., 1990; Rossignol et al., 1996; Brustein et Rossignol, 1998; Brustein et Rossignol, 1999) voir particulièrement (Rossignol et al., 1999). En effet, dans le premier mois suivant les lésions les plus étendues, les chats ne peuvent marcher volontairement. Avec l'entraînement, ils récupèrent leurs capacités locomotrices mais conservent des déficits de support de poids et de la coordination des membres antérieurs et postérieurs. Un des mécanismes de récupération possible serait la compensation des déficits par les fibres réticulospinales non lésées du funicule dorsolatéral ou une compensation des voies descendantes dans les funicules épargnés, notamment la voie corticospinale (Rossignol et al., 1999) ou par les voies propriospinales longues qui n'ont pas été étudiées dans ce contexte.

### Système latéral

#### *Voie rubrospinale*

La voie rubrospinale prend son origine au niveau de la portion magnocellulaire du noyau rouge dans le mésencéphale. Les axones de ces cellules traversent la ligne médiane au niveau du mésencéphale, projettent dans le funicule dorsolatéral, et se terminent au niveau des interneurons situés dorsolatralement dans la zone intermédiaire de la matière grise (Figure 4). Le système rubrospinal contrôle les muscles distaux des membres chez le chat et le singe pour la manipulation d'objet par exemple (Van Kan et McCurdy, 2001; Houk et al., 1988). Chez l'humain et les singes anthropoïdes, ce rôle revient au système corticospinal (Kuypers, 1982).

Au repos, la stimulation du noyau rouge facilite l'activation des motoneurons fléchisseurs (Orlovsky, 1972c). Durant la locomotion, ces neurones sont actifs rythmiquement surtout dans la phase de balancement du membre controlatéral, en augmentant l'amplitude de la bouffée EMG dans les muscles fléchisseurs (Orlovsky, 1972c; Rho et al., 1999; Armstrong, 1986). Pendant la phase d'appui, la stimulation de la voie rubrospinale a peu d'effet sur les fléchisseurs et produit une combinaison de réponses facilitatrices et inhibitrices dans les muscles extenseurs (Orlovsky, 1972c; Rho et al., 1999). Ainsi, l'activité de cette voie dépend de la phase du cycle locomoteur. Bien que la voie rubrospinale ait un effet sur l'amplitude et la durée de l'EMG, elle n'a presque aucun effet

sur la durée du cycle et donc sur la fréquence de marche (Rho et al., 1999; Orlovsky, 1972c; Shik et Orlovsky, 1976).

Des lésions au niveau du noyau rouge rendent temporairement la locomotion moins stable, particulièrement aux niveaux des articulations distales, mais ne la bloque pas (Orlovsky, 1972c). Le noyau rouge ne serait donc pas indispensable à l'activité des fléchisseurs pendant la phase de balancement (Armstrong, 1986).

### *Voie corticospinale*

La voie corticospinale émergeant du cortex cérébral est déterminante dans l'induction de la locomotion volontaire. Chez le chat, elle émerge principalement du cortex péricrucié (Chambers et Liu, 1957; Kuypers, 1964) et passerait par la capsule interne pour former la pyramide bulbaire au niveau du tronc cérébral. Les trois quarts des fibres corticales traversent la ligne médiane au niveau de la décussation pyramidale (jonction entre le bulbe et la moelle épinière) et forment la voie corticospinale latérale.

Ce faisceau projette via le funicule dorsolatéral aux interneurones situés dorsolateralement et dans la zone intermédiaire (voir Figure 4), chevauchant le site de terminaisons des projections rubrospinales (Kuypers, 1964). Ces connections directes aux interneurones permettraient de coordonner de grands groupes musculaires pour des tâches d'atteinte et de locomotion. Seules quelques fibres se retrouvent dans la corne ventrale du chat, mais ne contactent pas directement les motoneurones (Chambers et Liu, 1957; Fujito et Aoki, 1995), contrairement au singe, au chimpanzé et à l'homme (Kuypers, 1982). Le quart des fibres corticales ne traversent pas la ligne médiane au niveau de la décussation pyramidale et forment la voie corticospinale médiane qui descend ipsilatéralement dans le funicule ventral. Elle projette bilatéralement dans la portion ventromédiane de la zone intermédiaire et aux motoneurones des muscles axiaux.

La voie corticospinale a une fonction similaire à celle du noyau rouge (Orlovsky, 1972c). Au repos, elle facilite l'activation des fléchisseurs et, pendant la locomotion, son activité est rythmique et en phase avec le balancement du membre contralatéral. De plus, elle peut ré-initialiser (reset) le cycle locomoteur en provoquant la fin prématurée de la phase d'appui et en initialisant la phase de balancement (Rho et al., 1999; Drew et al., 2004). Cependant chez le chat, le cortex cérébral est principalement impliqué dans les

situations où l'animal doit modifier son rythme locomoteur de base pour s'adapter au terrain sur lequel il progresse (Drew et al., 2004). En effet, lors d'enregistrements de l'activité neuronale des cellules corticales, la majorité des neurones augmentent leur décharge pendant les modifications volontaires du patron locomoteur, soit en plaçant leur patte précisément sur la barre d'une échelle (Amos et al., 1990; Armstrong, 1986) soit en enjambant un obstacle (Beloozerova et Sirota, 1993; Drew et Rossignol, 1988; Drew, 1993; Drew et al., 1996). Cette augmentation de décharge survient surtout pendant la période d'activité modifiée des muscles fléchisseurs. De plus, des lésions corticales ont peu d'effet sur les capacités locomotrices des animaux, mais ceux-ci présenteront des déficits locomoteurs majeurs dans des situations qui nécessitent plus d'adresse, comme marcher sur les barres d'une échelle horizontale (Drew et al., 1996).

Chez l'homme, de récentes études ont démontré que les neurones du cortex moteur contribuaient directement à l'activité EMG des muscles de la cheville pendant la locomotion, via la voie corticospinale (Petersen et al., 2001). De même, suite à une lésion du cortex moteur ou une interruption de la voie corticospinale, des déficits locomoteurs importants sont observés pendant la marche (Knutsson et Richards, 1979; Calancie et al., 1999), notamment une diminution importante de la flexion dorsale de la cheville durant la phase de balancement (le pied tombant). Un tel déficit serait causé par un changement dans la synchronisation des muscles fléchisseurs agissant aux niveau des différentes articulations. (Jiang et Drew, 1996; Rossignol et al., 1996; de Leon et al., 1999a).

Tout comme pour le système médian, des études de lésions des voies du système latéral donnent encore plus de détails sur leur rôle dans la locomotion. En effet une section complète des voies dorsales et dorsolatérales au niveau thoracique T13, qui interrompt l'innervation de la moitié dorsale de la moelle épinière dont les voies corticospinales, ne bloque pas la locomotion sur tapis roulant des chats (Jiang et Drew, 1996; Rossignol et al., 1999). Cependant, les animaux trainent la patte au début de la phase de balancement et ne peuvent plus enjambrer correctement des obstacles placés sur le tapis roulant sans les heurter.

Les voies cortico- et rubrospinales projettent dans les funicules dorsolatéraux et se terminent au niveau des interneurons de la corne dorsale et de la zone intermédiaire dorsolatérale. Ils peuvent moduler la structure de l'activité EMG au cours du cycle de marche, mais seule la voie corticospinale latérale peut réinitier la locomotion.

En somme, les voies issues de ces 2 systèmes peuvent déclencher le générateur locomoteur spinal, contrôler l'intensité de la locomotion, maintenir l'équilibre pendant la locomotion et permettre l'adaptation des mouvements des membres et du corps aux conditions externes. Pendant la locomotion, chacune de ces voies déchargent en phase avec l'activité des muscles sur lesquels ils exercent une influence excitatrice (Shik et Orlovsky, 1976). Même si toutes ces voies peuvent contrôler la structure de l'activité EMG du cycle de marche, la voie corticospinale semble avoir un accès privilégié aux circuits spinaux lui permettant de modifier le rythme locomoteur chez une préparation marchante (Orlovsky, 1972c; Rho et al., 1999). De plus, une lésion à l'un de ces 2 systèmes ne bloque pas la locomotion, ce qui suggère que les signaux spécifiques d'une voie ou de l'autre ne sont pas essentiels. Cette redondance dans les possibilités d'évoquer la locomotion par plusieurs voies descendantes rend possible la récupération fonctionnelle des lésions partielles de la moelle épinière et justifie aussi qu'une stimulation électrique non spécifique puisse être utilisée aux mêmes fins.

Tel qu'exposé précédemment, les voies descendantes sont déterminantes pour la configuration de la matière blanche et grise spinale. Comme nous allons stimuler les différentes régions de la moelle épinière, une idée de la localisation de ces voies ainsi que leur fonction est pertinente. Ainsi, on pourrait s'attendre à ce que des stimulations des parties dorsales stimulent la portion restante des voies cortico- et rubrospinale présentes dans les funicules ou les interneurons préalablement contactés par ces voies. Des réponses de flexion du membre postérieur seraient donc plus probables. Au contraire, la stimulation des régions ventrales de la moelle épinière activerait des interneurons principalement contactés par le système médian. On pourrait donc s'attendre à des réponses d'extension du membre postérieur, bien que la voie réticulospinal latérale puissent induire des mouvements de flexion.

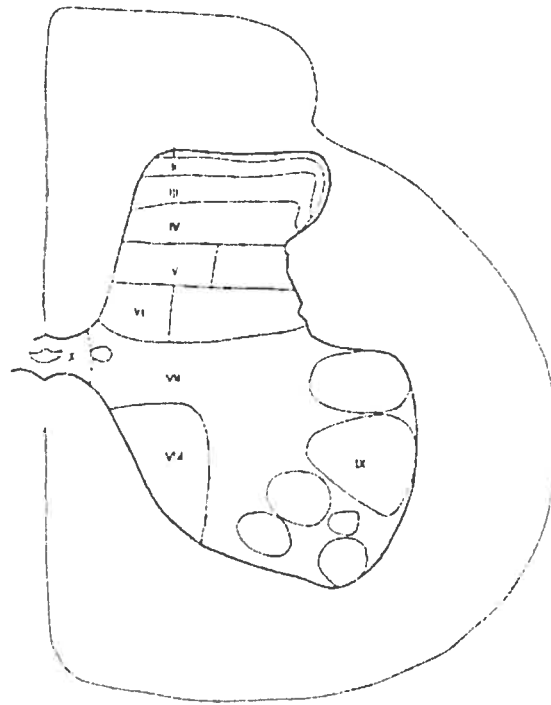
*La description anatomique des voies descendantes et de leur cible au niveau de la moelle épinière serait donc utile pour tenter de déterminer les neurones ou les voies qui pourraient être activés par la stimulation électrique.*

## Anatomie de la moelle épinière

### Matière blanche

La moelle épinière lombaire du chat comporte 7 segments. Sur une vue transversale, la moelle épinière est composée d'une matière grise centrale, entourée de la matière blanche (Figure 5). La matière blanche est composée d'axones myélinisés et est délimitée par la forme de la matière grise en 3 faisceaux distincts : le faisceau (ou colonne) dorsal, latéral et ventral. Les axones du faisceau dorsal proviennent des afférences somatosensorielles qui sont en fait les branches ascendantes des afférences sensorielles, et qui acheminent l'information de la périphérie vers les centres supraspinaux. Ces afférences sont arrangées de manière somatotopique et gardent cette topographie jusqu'au niveau supraspinal. En effet, les axones qui entrent dans la moelle épinière à la région sacrée sont placés très près de la ligne médiale du faisceau dorsal et les niveaux plus rostraux (lombaire, thoracique, cervical) sont localisés progressivement plus latéralement. Au niveau cervical, le faisceau d'axone situé médialement et provenant de la partie inférieure du corps se nomme faisceau grêle. Le faisceau latéral provenant de la partie supérieure du corps se nomme faisceau cunéiforme.

Ces deux faisceaux se terminent dans des noyaux distincts du tronc cérébral, soit les noyaux grêle et cunéiforme respectivement. Les colonnes dorsales contiennent aussi des voies se terminant au niveau du noyau Z (ou X) du tronc cérébral (Low et al, 1986; Johansson et Silfvenius, 1977; Mackel et Miyashita, 1993). Ces voies transmettent l'information des fuseaux neuro-musculaires de la patte postérieure. Les faisceaux latéral et ventral comprennent les voies descendantes motrices telles que décrites dans une section précédente. Ces voies proviennent de différentes structures du tronc cérébral et du cortex et sont distribuées dans les faisceaux ventraux et latéraux selon qu'elles font partie du système médian ou latéral et chacune contacte des zones bien précises de la matière grise. Ces faisceaux comportent aussi des voies propriospinales venant d'interneurones projetant leurs axones dans des segments spinaux distants, via les funicules ventral et latéral. De même les voies ascendantes provenant des afférences nociceptives et thermiques projettent dans le faisceau ventrolatéral.



**Figure 5. Section transversale de la moelle épinière du chat au segment L7**

La moelle présente une partie centrale, la substance grise, et une partie périphérique, nommée la substance blanche. Selon la terminologie de Rexed, il existe dix couches numérotées en chiffres romains de I à X, dans la substance grise de la moelle épinière. Ces couches diffèrent entre autres par leur cytoarchitecture. La substance blanche contient très peu de neurones et est essentiellement formée de fibres ascendantes et descendantes, myélinisées ou non, ainsi que des cellules gliales. Elle est divisée en 3 funicules : le funicule dorsal, latéral et ventral.

(Reproduit de Rexed, 1952)

## **Matière grise**

La matière grise contient des corps cellulaires nerveux et gliaux et apparaît en forme de H sur les sections transverses. Elle est divisée en corne ventrale, zone intermédiaire et corne dorsale, et plus précisément en lamina selon la cytoarchitecture des neurones qui s'y trouvent (Figure 5; Rexed, 1952; Schoenen et Faull, 1990). La corne dorsale est formée des laminae I à VI et comprend des neurones sensoriels de relais (c'est-à-dire contactés directement par les afférences primaires). Les neurones situés dans les lamina I et II reçoivent principalement les signaux des afférences nociceptives des fibres myélinisées A delta et non-myélinisées C. Les neurones des couches III à VI sont principalement contactés par les terminaisons des fibres Ia ou Ib. Les neurones des couches III à VI sont aussi contactés par les voies descendantes issues du cortex cérébral, du noyau rouge et des afférences monoaminergiques. Ces interneurones médient donc les effets de facilitation des fléchisseurs évoqués par la stimulation de ces voies, ainsi que les mouvements plus distaux des membres.

La zone intermédiaire, la lamina VII, comprend plusieurs populations d'interneurones impliqués dans des circuits de réflexes segmentaires dont les interneurones inhibiteurs Ia, Ib et les interneurones recevant les afférences de réflexe de flexion (FRA). Ces interneurones intègrent les signaux des fibres afférentes primaires et des voies descendantes. Ils envoient leurs axones notamment sur les motoneurones de la couche IX, le plus souvent après un trajet ascendant ou descendant de plusieurs segments. La couche VII contient aussi des neurones projetant vers les centres supraspinaux, tel que le noyau dorsal de Clarke qui donnerait naissance au faisceau spino-cérébelleux dorsal (DSCT; aussi impliqué dans la coordination entre les membres antérieurs et postérieurs) ainsi que les neurones qui projettent au cervelet dans le faisceau spino-cérébelleux ventral (VSCT). La partie interne de la corne ventrale est occupée par la lamina VIII comprenant les interneurones de Renshaw et les neurones commissuraux. Ces neurones reçoivent la majorité de leurs afférences du cortex, du noyau vestibulaire, de la formation réticulée ainsi que des noyaux monoaminergiques du tronc cérébral. Ils seraient donc impliqués dans la facilitation des muscles extenseurs au cours de la locomotion et dans la posture, ainsi que dans l'activation des muscles proximaux. Les axones des interneurones commissuraux traversent la ligne médiane (commissure) et contactent des cibles neuronales

controlatérales. Ces neurones seraient potentiellement impliqués dans la coordination droite-gauche pendant la locomotion.

La corne ventrale contient aussi les noyaux moteurs (ou groupe de motoneurones) innervant les muscles (couche IX). Ces noyaux sont topographiquement organisés : les neurones innervant le même muscle forment des colonnes rostrocaudales correspondant aux noyaux moteurs et s'étendent sur un à quatre segments spinaux (Vanderhorst et Holstege, 1997; Romanes, 1951). L'organisation spatiale de ces noyaux moteurs suit un patron de distribution médiolatéral, i.e. les noyaux moteurs innervant les muscles axiaux se trouvent dans la partie médiane de la corne ventrale, alors que ceux innervant les muscles des membres, sont localisés progressivement plus latéralement selon qu'ils innervent un muscle proximal ou distal. Les noyaux moteurs sont aussi organisés rostrocaudalement. Les noyaux moteurs innervant les muscles antérieurs (au devant de la patte) sont généralement situés plus rostralement dans le renflement que ceux innervant les muscles postérieurs (à l'arrière de la patte) (Vanderhorst et Holstege, 1997). D'autres auteurs suggèrent aussi que les noyaux moteurs innervant les muscles proximaux sont généralement situés plus rostralement dans le renflement que ceux innervant les muscles distaux (McHanwell et Biscoe, 1981; Nicolopoulos-Stournaras et Iles, 1983; Vanderhorst et Holstege, 1997). Finalement une distribution dorsoventrale a été établie, où les muscles des articulations plus distales sont représentés dans des noyaux moteurs plus dorsaux de la corne ventrale. Au niveau de la moelle épinière cervicale, les fléchisseurs sont localisés plus dorsalement que les extenseurs, mais cette observation ne semble pas s'appliquer à la moelle épinière lombaire (Vanderhorst et Holstege, 1997; Sterling et Kuypers, 1967). Se basant sur la distribution des noyaux moteurs et sur le patron temporel de décharge les muscles qu'ils innervent au cours de la locomotion, Yakovenko et al (2002) ont décrit le patron temporel d'activation des motoneurones pendant la locomotion chez le chat. Leurs travaux ont montré qu'en général les motoneurones étaient activés rostrocaudalement au cours du patron locomoteur. De plus, étant donné que certains muscles, comme St sont représentés sur plusieurs niveaux, ils pourront être activés directement par la stimulation électrique à différents segments. La dernière couche, la lamina X, est constituée de cellules entourant le canal épendymaire. Certaines études suggèrent qu'ils feraient partie d'un réseau propriospinal permettant la genèse de la locomotion (Huang et al., 2000; Sherriff et Henderson, 1994).



*La distribution des motoneurones et interneurones de la moelle épinière aura une influence certaine sur les réponses que l'on pourra évoquer avec la stimulation électrique.*

## **Composantes de la circuiterie spinale de locomotion**

Assurant l'intégration entre les influx descendants et les influx périphériques destinés aux motoneurones (Lundberg, 1979; Jankowska et Lundberg, 1981; Baldissera et al., 1981), les interneurones jouent un rôle déterminant dans la modulation des circuits réflexes et permettent une adaptation rapide de l'activité motrice (Pierrot-Deseilligny et Mazieres, 1984; Rossignol et al., 2006). De plus, certains d'entre eux seraient importants pour le déclenchement et la formation du patron locomoteur et pourraient constituer des cibles directes ou indirectes de la stimulation électrique intraspinale.

### **Interneurones inhibiteurs Ia et cellules de Renshaw**

Les interneurones inhibiteurs Ia sont contactés par les afférences Ia des fuseaux neuromusculaires d'un muscle agoniste et inhibent les motoneurones du muscle antagoniste. Au cours de la locomotion, ces interneurones sont actifs dans la phase du cycle locomoteur où le muscle agoniste est actif et contribuent à l'inhibition des antagonistes durant la locomotion (Feldman et Orlovsky, 1975; McCrea et al., 1980).

Les cellules de Renshaw inhibent les motoneurones dont ils reçoivent leur activation mais aussi d'autres interneurones (Eccles et al., 1961; Hultborn et al., 1971; Baldissera et al., 1981). Ils sont actifs rythmiquement pendant la locomotion et leur bouffée d'activité est en phase avec celle du motoneurone afférent pendant la locomotion fictive induite par stimulation de la MLR (McCrea et al., 1980).

Bien que ces 2 types de neurones soient actifs rythmiquement pendant la locomotion, une injection de strychnine bloquant les inputs glycinergiques des cellules de Renshaw et des interneurones inhibiteurs Ia n'élimine pas la locomotion fictive induite par stimulation de la MLR (Pratt et Jordan, 1987). Donc, bien que ces 2 types d'interneurones puissent moduler l'activité locomotrice, ils ne seraient pas nécessaires à son induction.

### **Interneurones commissuraux**

Une population d'interneurones commissuraux a récemment été décrite chez le chat au niveau des segments L4-L7 (Matsuyama et al., 2004, 2006). La majorité de ces neurones sont localisés dans la lamina VIII. Ils projettent au niveau des noyaux moteurs controlatéraux ainsi que des laminae VIII et VII controlatérales et déchargent rythmiquement au cours de la locomotion. Les neurones commissuraux de la lamina VIII reçoivent les afférences de la voie réticulospinale. Or, la MLR évoque la locomotion en passant par la voie réticulospinale. On pourrait conclure que les neurones commissuraux seraient importants dans l'activation du patron locomoteur (Matsuyama et al., 2004; Jankowska, 2005).

En plus des données chez le chat suggèrent fortement l'implication prépondérante des interneurones commissuraux dans la locomotion, d'autres données suggérant l'implication de ces neurones dans le CPG locomoteur sont venues d'expériences chez le rat néonatal en locomotion fictive. Certains neurones commissuraux des segments L2-L3 déchargent rythmiquement et ont des projections descendantes vers les segments L4 et L5 du côté controlatéral (Butt et al., 2002). Étant donné leur projections et leur activité pendant la locomotion, ces neurones auraient un rôle dans la coordination intermembre des fléchisseurs et extenseurs des 2 côtés de la moelle épinière (Butt et Kiehn, 2003). Cependant, de récentes évidences suggèrent que les axones croisés des interneurones commissuraux ne seraient pas nécessaires à la génération de bouffées rythmiques dans une hémi-moelle. En effet chez la lamproie, le rythme moteur peut être évoqué dans un côté suite à une lésion de la moelle épinière le long de la ligne médiane (Cangiano et Grillner, 2003b). De plus, le chat spinal chronique peut marcher avec un seul membre postérieur (Grillner et Rossignol, 1978). Dans l'étude présentée dans le chapitre 3 de cette thèse, nous avons aussi observé des mouvements locomoteurs restreints à un seul membre. Donc bien que les interneurones commissuraux soient importants pour la locomotion bilatérale, ils ne sont pas essentiels pour l'activité locomotrice dans un membre.

### **Interneurones FRA**

Comme mentionné précédemment, les interneurones FRA, situés dans la région intermédiaire de la moelle épinière (Jankowska et al., 1967b), constituaient la première

évidence expérimentale supportant la théorie des demi-centres, telle que suggérée par Brown (1911). Ces interneurones reçoivent plusieurs types d'afférences dont les afférences musculaires à haut seuil de groupe II et III, les afférences articulaires et cutanées (Eccles et Lundberg 1979; Holmqvist et Lundberg, 1961), et déclenchent les réflexes nociceptifs (aussi appelé réflexe de flexion). Lorsqu'elles sont actives, ces afférences exercent un effet inhibiteur sur les motoneurones des muscles extenseurs ipsilatéraux et un effet excitateur sur les motoneurones des muscles fléchisseurs, pour permettre un retrait du membre affecté de l'input nociceptif. Controlatéralement leur effet est inverse : en déclenchant une excitation des extenseurs et une inhibition des fléchisseurs, ce réflexe permet au membre opposé de supporter le poids du corps très rapidement. Au cours de la locomotion fictive induite par L-DOPA chez des chats spinaux curarisés, ces interneurones peuvent réinitialiser le cycle locomoteur (Schomburg et al., 1998). En effet, la stimulation des afférences à haut seuil au cours de la phase d'extension interrompt l'activité des muscles extenseurs et déclenchent la phase de flexion. Ces interneurones pourraient donc être considérés comme des éléments du générateur spinal de la locomotion.

### **Interneurones de groupe II**

Bien que les afférences de groupe II soient incluses dans les FRA, les interneurones étant principalement contactés par ces afférences forment une population neuronale distincte qui a été largement décrite chez le chat. Une population d'interneurones de groupe II est concentrée au niveau des segments L3, L4 et la partie rostrale de L5 (Edgley et Jankowska, 1987a; Edgley et Jankowska, 1987b; Lundberg et al., 1987a; Lundberg et al., 1987b). Ils sont ainsi situés rostralement aux principaux noyaux moteurs et sont localisés dans des segments importants pour l'induction de la locomotion (Marcoux et Rossignol 2000; Langlet et al, 2005).

D'après leur localisation, les interneurones de groupe II seraient séparés en deux populations, dont l'une au niveau de la corne dorsale (laminae IV-V) et l'autre au niveau de la zone intermédiaire/corne ventrale (laminae VI, VII, VIII) (Kostyuk et Vasilenko, 1979; Kostyuk et al., 1971; Bras et al., 1989a; Edgley et Jankowska, 1987a). Ils reçoivent leurs afférences principalement des afférences du groupe II des muscles fléchisseurs de la hanche, (Kirkwood et al., 1987; Edgley et Jankowska, 1987b; Lundberg et al., 1987b) ainsi que par les fibres cortico-, rubro-, réticulo- et/ou vestibulospinales (Edgley et al., 1988;

Suzuki et al., 1985). Étant principalement contactés par les afférences des fléchisseurs de la hanche, Edgley et Jankowska ont émis l'hypothèse que les interneurons du groupes II seraient principalement activés au cours de la transition entre la phase d'appui et de balancement, étant donné l'importance des fléchisseurs de la hanche dans cette transition (Rossignol et Gauthier, 1980; Grillner et Rossignol, 1978). Cette hypothèse a été validée par Shefchyk et coll. (1990) qui a démontré, chez un chat décérébré marchant avec stimulation de la MLR, qu'une majorité d'interneurons de groupe II étaient actifs pendant la phase de balancement du cycle de marche et aussi pendant la transition entre les phases d'appui et de balancement du cycle locomoteur.

Les terminaisons axonales des interneurons de groupe II de la zone intermédiaire/corne ventrale contactent monosynaptiquement les motoneurons des différents noyaux moteurs ipsilatéraux. Ils envoient leurs axones dans la partie ventrale du funicule latéral ou dans la partie latérale du funicule ventral pour atteindre les motoneurons du renflement lombosacré (Edgley et Jankowska, 1987a; Cavallari et al., 1987). Les neurones situés dans la corne dorsale envoient leurs axones ipsilatéralement via la partie dorsale du funicule latéral ou contralatéralement via le funicule ventral, mais aucune de leurs terminaisons ne se retrouvent au niveau d'un noyau moteur. Leurs terminaisons sont excitatrices ou inhibitrices et contactent principalement d'autres interneurons du groupe II. En somme, la convergence d'informations sur ces interneurons et la distribution de leurs efférences justifieraient une implication dans le réseau locomoteur lombaire de chats intacts et spinaux. Pour déterminer si l'activité des interneurons du groupe II du segment L4 est liée à l'activité des réseaux neuronaux qui évoque la locomotion, les réponses de ces neurones lors de deux procédures qui normalement induisent la locomotion ont été étudiées (Edgley et al., 1988). Premièrement, chez des chats anesthésiés, ils ont stimulé électriquement la MLR et ont observé que la stimulation électrique excite disynaptiquement un grand nombre de neurones de groupe II localisés dans la zone intermédiaire/corne ventrale du segment L4. Donc les neurones de la MLR contacteraient des cellules réticulospinales dans la formation réticulée qui projetteraient directement aux interneurons du groupe II. Deuxièmement, chez des chats décérébrés et spinalisés, l'administration de la L-DOPA a un effet dépresseur sur les neurones situés dans la zone intermédiaire et de la corne ventrale. On aurait pu s'attendre à ce que l'effet soit inverse et que l'administration de DOPA, qui induit la locomotion, facilite les réponses des

interneurones impliqués dans l'induction du rythme locomoteur. Cependant, comme ces deux approches n'ont eu aucun effet sur les interneurones de groupe II situés dans la corne dorsale, l'activité des interneurones de groupe II situé ventralement devrait être relié au réseau générant la locomotion, même si leur rôle exact n'est pas encore connu.

Ces résultats sont supportés par d'autres études montrant que l'application locale de noradrénaline ou d'un agoniste alpha-2 diminue ou abolie les réponses des interneurones de la zone intermédiaire/corne ventrale suite à la stimulation des afférences de groupe II. Aucun effet n'a été observé sur les interneurones situés dans la corne dorsale (Bras et al., 1990). Les effets d'agonistes alpha-2 sont similaires aux effets de la L-Dopa et suggèrent aussi un rôle de ces interneurones dans la locomotion. Il est intéressant de noter qu'une injection intraspinale d'antagonistes monoaminergiques réduit l'effet dépresseur des monoamines sur ces réponses (Skoog et Noga, 1991). Toutes ces expériences ont été effectuées sur des chats intacts, anesthésiés ou spinaux aigus et suggèrent que l'activité des interneurones de groupe II situés au niveau de la corne ventrale/zone intermédiaire du segment L4 est relié à la locomotion. Donc, ces interneurones pourraient plus précisément être reliés au déclenchement de rythme locomoteur.

Un deuxième groupe d'interneurones recevant un input dominant des afférences du groupe II se situe dans les segments L6-L7, mais ont fait l'objet d'un moins grand nombre de recherches (Riddell et Hadian, 2000). Ces interneurones reçoivent principalement des afférences du quadriceps et des muscles péronniers profonds. Près de la moitié de ces interneurones projettent ipsilatéralement au segment L4 et une autre partie projette au niveau des noyaux moteurs. Leur implication dans le réseau locomoteur n'a pas été défini.

*La stimulation électrique active sans doute tous ces neurones directement ou indirectement, et les réponses évoquées pourraient refléter les caractéristiques de l'un ou l'autre de ces neurones. Les interneurones de groupe II localisés au niveau du segment L4, sont particulièrement intéressants dans le contexte où les expériences menées précédemment au laboratoire ont démontré l'importance de ces segments dans la locomotion spinale. Ils pourraient donc être activés de manière prépondérante par la stimulation électrique.*

Plusieurs classes de neurones reliés à la locomotion ont aussi un rôle d'intégration des afférences descendantes et propriospinales. Cette convergence rend possible le déclenchement de la locomotion par les voies descendantes mais aussi par les afférences, et est nécessaire pour produire 'une locomotion comportementalement pertinente' (behaviourally relevant locomotion; Grillner, 1981) .

## **Afférences sensorielles**

La locomotion est aussi modulée par les voies sensorielles qui projettent vers les circuits locomoteurs spinaux. Comme nous le verrons dans la description des résultats de cette thèse, la stimulation de racines dorsales de même que la microstimulation électrique de la moelle épinière exciteraient des voies sensorielles et il est donc important de comprendre le rôle que ces afférences jouent normalement dans le contrôle locomoteur.

Les signaux sensoriels générés par les muscles et les articulations pendant ces mouvements sont considérés comme des signaux proprioceptifs. Les signaux évoqués par une déformation de la peau et activant des mécanorécepteurs sont des signaux cutanés. Ces signaux se rendent à la moelle épinière via les nerfs afférents (sensoriels), en passant par les ganglions des racines dorsales où se situent leur corps cellulaires. L'ensemble des terminaisons sensorielles, de l'axone, du corps cellulaire et de l'axone central constitue le neurone primaire ou l'afférence primaire. Les afférences primaires ont des effets distincts sur les mouvements des membres en contactant directement soit les motoneurones pour activer un muscle (circuit réflexe monosynaptique), soit des interneurones qui agiraient subséquemment sur les motoneurones (circuits réflexes di- ou polysynaptiques). Ainsi, tout comme les centres supraspinaux, les afférences périphériques peuvent moduler le patron locomoteur en fonction de l'environnement. Les informations parviennent à la moelle épinière via diverses afférences nociceptives, proprioceptives et cutanées. Cependant, dans cette section, l'emphasis sera mise sur l'implication des deux derniers types d'afférences dans la locomotion.

## **Afférences sensorielles nécessaires au déclenchement de la locomotion**

### Propriocepteurs de la hanche

Les propriocepteurs de la hanche semblent exercer un contrôle puissant sur le déclenchement du rythme locomoteur et sur sa fréquence. Sherrington (1910b) observait que l'extension passive des membres postérieurs chez un chat spinal (en le soulevant dans les airs par le thorax) évoquait des mouvements locomoteurs (air stepping). Une flexion de la hanche abolissait l'expression de ces mouvements. Grillner et Rossignol (1978) ont aussi montré chez un chat spinal chronique marchant sur tapis roulant que l'initiation de la phase de balancement dépend du degré d'extension de la hanche. De plus, en bloquant mécaniquement l'extension de la patte, la transition de la phase d'appui à la phase de balancement ne s'effectue pas. Ces expériences suggèrent donc que la position de la hanche ainsi que le degré d'étirement des muscles fléchisseurs de la hanche sont critiques pour cette transition. Les afférences cutanées ne seraient pas impliquées dans ce mécanisme étant donné que l'ablation de la peau n'abolit pas cette réponse (Sherrington, 1910b).

La position statique de la hanche influence aussi de manière marquée le patron locomoteur fictif enregistré dans les nerfs des muscles de la patte postérieure (Pearson et Rossignol, 1991). En effet, chez un chat paralysé, une flexion de la hanche abolit la locomotion fictive alors qu'une extension graduelle évoque un rythme locomoteur graduellement plus robuste jusqu'à ce que la limite de l'extension de la hanche soit atteinte. L'importance des afférences proprioceptives de la hanche pour la locomotion a été confirmée par d'autres expériences sur des préparations de chats décérébrés (Lam et Pearson, 2001). En modifiant la rétroaction afférente du sartorius pendant le balancement, soit en favorisant la flexion de la hanche, soit en l'opposant. Dans le cas où la flexion de la hanche était favorisée, l'ampleur et la durée de la décharge EMG du muscle iliopsoas, et aussi du sartorius étaient diminuées. Au contraire, quand la flexion de la hanche était résistée, la décharge des muscles fléchisseurs de la hanche était augmentée. Ainsi, l'activité des fléchisseurs de la hanche pendant la locomotion est fortement modulée par la rétroaction proprioceptive des muscles fléchisseurs de la hanche (Lam et Pearson, 2002; Lam et Pearson, 2001).

Les informations concernant l'étirement des muscles fléchisseurs sont transmises à la moelle épinière par les afférences de groupe Ia et II (Baldiçsera et al., 1981). Les

afférences du groupe Ia proviennent des fuseaux neuromusculaires primaires et sont activées par le degré d'étirement des muscles (sa longueur) ainsi que le changement de cet étirement. Ce sont des afférences de gros calibre (12-20  $\mu\text{m}$ ) ayant une vitesse de conduction élevée (72-120 m/s) et étant activés par des stimulations électriques de faible intensité. Les afférences de groupe II proviennent des fuseaux neuromusculaires secondaires et sont activées surtout par le degré d'étirement du muscle. Ce sont des afférences de calibres moyens (6-12  $\mu\text{m}$ ) ayant une vitesse de conduction plus basse que les afférences Ia (36-72 m/s) et étant activées par des stimulations électriques à plus haut seuil allant de 2-5 fois le seuil moteur (Edgley et Jankowska, 1987b). Ces deux types d'afférences projettent vers la moelle épinière à des endroits précis : les afférences du groupe Ia font synapse avec les interneurons Ia au niveau des laminae V à VIII ainsi que dans les noyaux moteurs, alors que les afférences de groupe II projettent sur les interneurons de groupe II, dans les laminae IV à VIII, et aussi dans les noyaux moteurs. Les afférences de différents muscles projettent vers la moelle épinière à différents niveaux. Au niveau de la hanche les afférences Ia et II projettent vers le segment L4. Des études menées précédemment dans le laboratoire du Dr Rossignol, ainsi que mes propres résultats suggèrent d'ailleurs un rôle primordial du segment L4 dans la locomotion.

Les afférences primaires Ia et II demeurent très importantes dans la modulation de la locomotion même en présence des voies supraspinales du tronc cérébral. En effet, la locomotion évoquée par stimulation de la MLR et enregistrée au niveau des racines ventrales peut être abolie par des manipulations passives de la patte postérieure (Orlovsky, 1972a). De plus, la hanche exerce un rôle global sur l'organisation de la séquence locomotrice aux autres articulations, car retarder ou accélérer le mouvement de la hanche pendant la locomotion affecte le mouvement aux articulations plus distales (Rossignol, 1996).

Ainsi, le degré d'extension de la hanche et d'étirement des fléchisseurs de la hanche semblent être un élément clé pour initier la phase de balancement. Cependant, différentes études suggèrent que la diminution de la charge ou de la tension (load) sur les muscles extenseurs, notamment de la cheville, est aussi critique pour induire la locomotion.



### Délestage des extenseurs de la cheville dans l'initiation du balancement

Les afférences sensorielles codant pour la tension musculaire (load) sont les afférences du groupe Ib provenant des organes tendineux de Golgi situés au niveau du tendon du muscle (voir Duysens et al., 2000). Au repos, les fibres Ib des extenseurs de la cheville font synapse avec les interneurons inhibiteurs Ib pour limiter la tension exercée sur le tendon et donc la contraction de ces muscles. Cependant, au cours de la locomotion, l'activation des afférences Ib excite polysynaptiquement les extenseurs de la cheville (Gossard et al., 1994; Pearson et Collins, 1993; Pearson et al., 1992c). Une excitation des afférences Ib sur les muscles extenseurs de la cheville au cours de la locomotion a aussi été observée chez des chats décérébrés, marchant sur tapis roulant (Duysens et Pearson, 1980). Cette inversion de réflexe pourrait être d'une importance majeure pendant la phase d'appui pour prévenir l'initiation de la phase de balancement tant que le poids du corps repose fortement sur cette patte (Rossignol, 1996). Ainsi, le délestage des muscles extenseurs de la cheville au cours de la locomotion est un signal crucial car il signale l'arrêt de la phase d'appui et le début de la phase de balancement (Duysens et Pearson, 1980). Ces 2 inputs, la tension dans les muscles extenseurs et la position de la hanche, sont acheminés au CPG et contribuent à l'induction de la locomotion.

### **Inputs sensoriels pouvant modifier la locomotion**

#### Fréquence de locomotion et réinitialisation du cycle locomoteur

Après spinalisation, les chats peuvent adapter leur patron locomoteur aux différentes vitesses du tapis roulant grâce aux afférences sensorielles (Forssberg et al., 1980a; Forssberg et al., 1980b; Grillner, 1981; Barbeau et Rossignol, 1987). Les expériences de chats marchant sur tapis roulant à deux courroies, c'est-à-dire où chaque patte marche sur une courroie ayant une vitesse différente, ont aussi mis en évidence l'implication prépondérante des afférences périphériques sur le mouvement locomoteur du membre qu'elles innervent (Forssberg et al., 1980b; Halbertsma, 1983)

La stimulation d'afférences musculaires spécifiques peut aussi avancer ou retarder le prochain cycle locomoteur. Chez le chat décérébré marchant sur tapis roulant, la stimulation des afférences Ia du muscle long extenseur des orteils (EDL) peut réinitier la

phase de flexion en écourtant la phase d'extension. La stimulation des afférences du groupe II du tibialis antérieur (TA) peut aussi réinitier le cycle locomoteur en induisant une phase de flexion prématurée (Hiebert et al., 1996). De plus, un court train de stimulation qui regroupe les afférences du groupe Ib du nerf Plantaris (extenseur) pendant la phase de flexion provoque un arrêt brutal de l'activité des muscles fléchisseurs et initie une bouffée EMG dans les muscles extenseurs (Conway et al., 1987). Ce changement temporel persiste au cours des cycles suivants. Un effet similaire de réinitialisation du cycle locomoteur de la patte antérieure du chat a aussi été observé en réponse aux mouvements phasiques de protraction et rétraction de l'épaule en locomotion fictive (Saltiel et Rossignol, 2004).

La stimulation de certaines afférences sensorielles peut aussi entraîner la locomotion à une fréquence donnée. En effet, le rythme de locomotion fictive chez le chat peut être entraîné par des mouvements sinusoïdaux de la hanche dans un ratio de 1 :1 ou une fraction de ce ratio (2 :1, 3 :1) selon la fréquence de stimulation utilisée (Andersson et Grillner, 1983). Des expériences de locomotion fictive induite par stimulation électrique de la MLR démontrent que l'entraînement serait dû aux afférences musculaires de la hanche reliées aux étirements périodiques des muscles autour de cette articulation et non aux afférences articulaires (ou capsulaire) de la hanche. En effet, l'entraînement demeure possible malgré une déafférentation capsulaire de la hanche (Kriellaars et al., 1994).

En somme, les inputs des différentes afférences musculaires sont importantes pour induire le cycle de marche, en moduler la fréquence, la durée ainsi que l'amplitude de l'output musculaire.

*La stimulation intraspinale et des racines dorsales pourraient activer ces afférences et avoir un effet sur la durée du cycle. Il serait ainsi possible d'entraîner le rythme locomoteur induit.*

#### Dépendance de la phase pour la transmission dans les afférences cutanées

Chez le chat spinal chronique, les réponses à la stimulation des afférences cutanées diffèrent selon la phase de marche à laquelle la stimulation est appliquée. Une perturbation mécanique appliquée sur la face dorsale du pied pendant la phase de balancement, évoque une réponse bien organisée visant à enjamber cet obstacle : une

flexion rapide du genou est effectuée pour retirer le pied de l'obstacle, suivie d'une flexion de la cheville et de la hanche pour passer au-dessus et en avant de l'obstacle (Forssberg et al., 1977). La même stimulation mécanique donnée pendant la phase d'appui n'évoque pas de réponse dans les muscles fléchisseurs mais plutôt une réponse à courte latence dans les muscles extenseurs, surtout chez les chats spinaux. Cette réponse semble contribuer à raccourcir la phase d'extension et induire précocement une nouvelle phase de balancement (Forssberg et al., 1977; Bélanger et al., 1988; Prochazka et al., 1978). Ces réponses sont d'origine cutanée, car après l'anesthésie locale de la face dorsale du pied, les mouvements complexes évoqués pendant la phase de balancement sont abolis (Forssberg et al., 1977; Prochazka et al., 1978), et seules les réponses induites par l'étirement des muscles lorsque le pied pousse contre l'obstacle demeurent. Ces réponses sont aussi observées chez le chat intact, suite à une stimulation mécanique ou un jet d'air (Forssberg, 1979). Donc, la réponse à une stimulation mécanique cutanée dépend de la phase à laquelle elle survient.

La stimulation électrique des nerfs cutanés évoque aussi des réponses dépendantes de la phase chez des chats intacts (Duysens et Loeb, 1980; Loeb, 1993), spinaux chroniques (Forssberg, 1979) ou spinaux curarisés (LaBella et al., 1992). Une stimulation pendant la phase de balancement évoque une excitation à courte latence dans les fléchisseurs du genou (St), mais induit une réponse inhibitrice suivie d'une excitation dans les extenseurs de la cheville au cours de la phase d'appui. Ces expériences sur des chats curarisés ont démontré que ces modulations résultent de mécanismes centraux de sélection interneuronale par les circuits générateurs ou l'interaction avec les voies afférentes lors de mouvements réels. Cette phase dépendance des réflexes est aussi observée chez l'humain (Bélanger et Patla, 1987; Dietz et al., 1986; Kanda et Sato, 1983; Yang et Stein, 1990; voir aussi Zehr et Stein, 1999) et est essentielle pour optimiser les mouvements compensatoires et minimiser les altérations du cycle de marche pendant la locomotion (Rossignol et al., 2006). En définitive, les afférences proprioceptives déterminent certaines caractéristiques du patron locomoteur. La stimulation électrique de ces afférences, par stimulation intraspinale ou de racines dorsales, pourraient influencer similairement le patron locomoteur.

En plus de moduler la locomotion, les afférences sensorielles évoquent des réflexes distincts. Un article influent sur les réponses réflexes chez le chat est paru au début du 20<sup>e</sup> siècle (Sherrington, 1910a). Sherrington fut l'un des premiers à décrire le réflexe de retrait classique, qui consiste en une flexion de toutes les articulations de la patte suite à une

stimulation nociceptive. Le patron cinématique de ce réflexe n'est pas fixe par contre, et dépend du nerf qui est stimulé. D'autres réflexes classiques ont été décrits dans cet article, notamment le réflexe d'extension (extensor thrust), la flexion ipsilatérale suivie d'une extension ipsilatérale (rebound extension following on reflex flexion), ainsi que l'extension croisée qui consiste en une flexion ipsilatérale accompagnée d'une extension controlatérale.

*La stimulation électrique de la moelle épinière ou des racines dorsales stimule toutes ces afférences et pourraient induire les mêmes réponses réflexes.*

## **Pharmacologie de la moelle épinière**

### **Système monoaminergique**

Au cours de nos travaux, l'utilisation de stimulations électriques se fera seule et en combinaison avec la clonidine, un agoniste des récepteurs noradrénergiques  $\alpha_2$ . Le choix de la clonidine comme agent pharmacologique est basé sur plusieurs études montrant son efficacité à induire la locomotion chez les chats spinaux. Aussi, la connaissance de la pharmacologie spinale nous permettra de comprendre les effets que l'injection de clonidine pourrait avoir sur les réponses évoquées par stimulation électrique.

Chez le chat spinal, le système noradrénergique est le seul à pouvoir déclencher la locomotion quelques jours seulement après une lésion spinale complète à T13 (Barbeau et al., 1987; Barbeau et Rossignol, 1991; Chau et al., 1998b; Chau et al., 1998a; Rossignol, 1996). Une injection intrathécale de clonidine (injection de 100-200  $\mu\text{g}/100 \mu\text{l}$ ; Rossignol et al., 2000) déclenche la locomotion chez le chat spinal et permet un entraînement sur tapis roulant pendant environ 4 à 6 heures. Un entraînement quotidien et précoce avec clonidine, commençant au 3<sup>e</sup> jour post-spinalisation, mène à une amélioration importante et accélérée de la récupération locomotrice sur le tapis roulant. Les chats récupèrent une locomotion avec contact plantaire et support de poids 6 à 11 jours après la spinalisation sans autre apport de clonidine. Une fois la locomotion récupérée, la clonidine continue de la moduler. Elle permet notamment une meilleure régularité et un allongement significatif du cycle de marche. La durée des bouffées musculaires est généralement augmentée, tandis que l'amplitude moyenne des EMGs demeure similaire ou augmente légèrement dans les fléchisseurs, et diminue dans les extenseurs. Cependant, la clonidine diminue l'excitabilité

cutanée, ce qui pourrait expliquer en partie le traînement de la patte observé lors de la locomotion spinale (Chau et al., 1998b; Barbeau et al., 1987), bien que celui-ci soit également vu sans clonidine.

*En somme, la clonidine est très efficace pour déclencher la locomotion chez les chats spinaux dans les jours suivants la spinalisation. Il pourrait donc faciliter l'induction de la locomotion par la stimulation électrique chez les chats spinaux de cette étude.*

D'autres neurotransmetteurs sont aussi présents dans la moelle épinière du chat intact, notamment la sérotonine. Cependant, les agonistes sérotoninergiques ne peuvent déclencher la locomotion dans la première semaine post-spinalisation, comme cela est possible avec la clonidine, mais peuvent moduler un patron locomoteur bien établi (Barbeau et Rossignol, 1990; Barbeau et al., 1993; Rossignol et al., 2002). Ils augmentent la longueur du pas et l'amplitude EMG des muscles fléchisseurs et extenseurs. De plus, l'excursion angulaire de toutes les articulations augmente principalement en flexion. La sérotonine agirait en augmentant l'excitabilité des neurones spinaux, incluant les motoneurones (Barbeau et Rossignol, 1990; Schmidt et Jordan, 2000; Bedard et al., 1987). En effet, une stimulation électrique de la face dorsale du pied, après l'injection d'un agoniste sérotoninergique, diminue l'intensité requise pour évoquer un réflexe de flexion (Barbeau et Rossignol, 1990).

Le locus coeruleus et le noyau raphe constituent respectivement les seules sources de noradrénaline et de sérotonine au niveau de la moelle épinière chez le chat. Bien que des agonistes noradrénergiques comme la clonidine permettent de déclencher la locomotion après spinalisation, la récupération de la locomotion est aussi possible uniquement par entraînement locomoteur, sans ajout d'agents pharmacologiques. L'activation des récepteurs noradrénergique ne serait donc pas nécessaire à l'expression spontanée de la locomotion spinale. Effectivement, l'injection intrathécale (i.t.) de yohimbine (antagoniste des récepteurs noradrénergiques) ne bloque pas la locomotion d'un chat spinal chronique (Giroux et al., 2001). Or, une telle injection chez un chat intact a des effets délétères sur la locomotion, principalement sur la coordination intermembre. Ainsi, le système noradrénergique est une composante importante dans la locomotion des chats intacts, mais ne semble pas essentielle à l'expression de la locomotion spinale spontanée.

L'effet des agonistes noradrénergiques et sérotoninergiques ne sont pas les mêmes selon que la lésion spinale est complète ou partielle (Brustein et Rossignol, 1999; Giroux et al., 1998; Rossignol et al., 2001). En effet, dans les premiers jours suite à une lésion ventrale et ventrolatérale importante, la noradrénaline semble bénéfique mais l'injection de clonidine est délétère, pouvant même abolir les capacités locomotrices commençant à être exprimée. L'activation des récepteurs pré- et postsynaptiques dans le cas du chat ayant une lésion spinale partielle pourrait être en cause. Cet effet néfaste de la clonidine a aussi été observé chez l'humain avec lésions spinales qui, en majorité, sont incomplètes (Dietz et al., 1995; Remy-Neris et al., 1999). Au contraire l'injection de la quipazine (agoniste sérotoninergique) est bénéfique et une combinaison de quipazine et de méthoxamine (agoniste noradrénergique  $\alpha 1$ ), peut améliorer significativement la qualité de la locomotion, incluant la régularité des cycles de marche et l'endurance.

### **Système glutamatergique**

Après spinalisation, les voies monoaminergiques sont interrompues et ne peuvent plus activer ou moduler la locomotion chez le chat. L'activation du CPG dépendra donc des neurotransmetteurs intrinsèques à la moelle, notamment le système glutamatergique. Des évidences chez la lamproie (Brodin et al., 1985; Brodin et Grillner, 1985) et chez le rat néonatal (Cazalets et al., 1992; Kiehn et al., 1992) suggèrent que les mécanismes glutamatergiques seraient responsables de la rythmicité endogène dans la moelle épinière. Ces mécanismes seraient aussi déterminants dans la locomotion des chats spinaux. L'administration i.t. d'un bloqueur des canaux NMDA, AP5, bloque la locomotion des chats spinaux chroniques alors qu'elle n'avait que des effets mineurs, principalement sur le support de poids, lorsqu'elle était injectée chez des chats intacts (Chau et al., 1994; Rossignol et al., 2001). De plus, l'injection de NMDA évoque des rythmes locomoteurs chez les chats paralysés décérébrés (Douglas et al., 1993). Ces résultats n'ont pas été observés chez le chat spinal (Chau et al., 1994; Rossignol et al., 2001). L'injection de NMDA très tôt après la spinalisation provoque un état hyperexcitable de la moelle épinière, caractérisé par des tremblements, de l'hyperreflexie et un écartement des orteils (toe fanning). Plus tard, lorsque des signes de rythmicité spinale organisée commencent à être observés, environ 5 à 7 jours après la lésion, l'injection de NMDA i.t. peut déclencher un

patron locomoteur complet qui demeure soutenu pendant plus de 48 heures. Dans une étape plus tardive de récupération, les effets du bloqueur AP5 peuvent être renversés par des injections de NMDA (Giroux et al., 1999; Chau et al., 2001).

### **Système propriospinal cholinergique**

Il est fort probable que la stimulation électrique appliquée avec une électrode de Tungstène à un site précis de la moelle épinière active directement ou indirectement les voies propriospinales, reliant les différents segments lombaires entre eux pour induire la locomotion. Un réseau propriospinal cholinergique a été mis en évidence et pourrait être activé pour induire la locomotion (Sherriff et Henderson, 1994; Huang et al., 2000).

Les terminaisons cholinergiques sont largement distribuées dans la moelle épinière, mais ces axones ne proviennent que d'un petit nombre de neurones localisés dans des zones bien précises. Pour identifier ces neurones cholinergiques propriospinaux dans la moelle thoraco-lombo-sacrée, Sherriff et Henderson (1994) ont utilisé un traceur rétrograde axonal combiné à la localisation immunohistochimique de la choline acetyl transférase, l'enzyme de synthèse de l'acétylcholine. Ils ont identifié 2 catégories de neurones propriospinaux cholinergiques : les cellules entourant le canal central (lamina X) et un groupe restreint de neurones situés dans la lamina VII nommés neurones de 'partition'. Une étude ultérieure a confirmé ces résultats et impliqué un autre groupe de cellules propriospinales cholinergiques qui serait situé dans les lamina VII et VIII : les interneurones commissuraux (Huang et al., 2000).

Ces trois populations de cellules seraient impliquées dans la locomotion chez le chat (Huang et al., 2000; Noga et al., 1995), le lapin (Viala et al., 1991), le rat neonatal (Cowley et Schmidt, 1994) et le têtard (Panchin et al., 1991). En effet, suite à une séquence de locomotion fictive prolongée (9 heures) induite par stimulation de la MLR, le nombre de neurones cholinergiques exprimant le marqueur d'activité *c-fos* est augmenté dans la moelle épinière lombaire de chats intacts (Huang et al., 2000). Ces changements sous-tendraient aussi la plasticité s'opérant lors de l'entraînement d'animaux spinaux. L'augmentation du marquage cholinergique est observée entre autres au niveau des segments lombaires moyens (L3-L4), dans les régions comprenant de localisation des interneurones de groupe II décrits préalablement.

## Mécanismes inhibiteurs

Tous les mécanismes décrits plus haut participent au déclenchement de la locomotion avant et après spinalisation. Ces travaux ont permis de comprendre certains changements pharmacologiques post-spinalisation qui seraient impliqués dans la récupération du patron locomoteur. Cependant, suite à une lésion spinale, certains mécanismes intrinsèques à la moelle demeurent intacts inhiberaient le réseau locomoteur spinal (Goldberger et Murray, 1988). En effet, Edgerton et ses collaborateurs ont montré une augmentation du niveau d'acide glutamique décarboxylase (GAD67), l'enzyme de synthèse du GABA, dans les neurones localisés sous le niveau de la spinalisation (Tillakaratne et al., 2000). Cette augmentation persiste jusqu'à 1 an après la lésion et est principalement localisée dans la corne dorsale (laminae II-VI), autour du canal central (X) ainsi que dans les laminae VII à IX. L'entraînement à la marche diminuerait les niveaux de GAD67. Ces résultats ont aussi été observés chez le rat où un niveau élevé de glycine est décelé chez les rats spinaux non entraînés à la marche, comparé aux rats contrôles ou aux rats spinaux entraînés à la marche (Edgerton et al., 2001). De même, l'administration de strychnine, un antagoniste glycinergique, dans la moelle épinière de chiens spinaux chroniques (Grillner, 1975; Orlovsky et Shik, 1976) ou de rats spinaux (Shik et Orlovsky, 1976) facilite l'expression de mouvements locomoteurs dans les membres postérieurs. D'autres travaux ont confirmé l'importance de l'inhibition glycinergique après spinalisation sur des chats spinaux entraînés à la marche ou à la station debout. Les chats entraînés à la station debout avaient de pauvres capacités locomotrices, mais l'administration de strychnine i.p. pouvait induire un patron locomoteur avec support de poids (de Leon et al., 1999b). Néanmoins, la strychnine n'avait aucun effet sur les chats entraînés à la marche qui exprimait un patron locomoteur approprié mais qui avaient plus de difficulté à se tenir debout. Les animaux entraînés à se tenir debout avaient probablement des niveaux plus élevés d'inhibition glycinergique qui seraient diminués par l'injection d'un antagoniste. Les capacités locomotrices d'un chat spinal seraient ainsi déterminées en partie par l'inhibition glycinergique et gabaergique à laquelle est soumis le générateur de patron locomoteur. Cette dernière expérience implique aussi que l'entraînement spécifique d'un chat spinal à la locomotion peut diminuer l'inhibition des réseaux locomoteurs.



*On pourrait donc penser qu'il serait plus facile d'induire la locomotion avec la stimulation électrique chez les chats entraînés que les chats non-entraînés.*

## **Plasticité**

Les expériences de stimulation électrique présentées dans cette thèse ont été effectuées chez des chats spinaux d'une semaine non-entraînés mais aussi sur des chats spinaux entraînés à marcher sur tapis roulant durant trois à cinq semaines. La chronicité de la lésion et l'entraînement locomoteur peuvent induire des changements plastiques au niveau spinal qui pourraient se refléter lorsque nous stimulons la moelle épinière. En effet, le potentiel plastique de la moelle épinière a été démontré dans plusieurs études.

## **Lésions musculaires**

Après une neurectomie de deux fléchisseurs de la cheville (tibialis anterior et extensor digitorum longus) effectuée unilatéralement, les chats intacts récupèrent rapidement la locomotion, malgré une diminution de la flexion de la cheville et une légère augmentation de la flexion de la hanche et du genou (Carrier et al. 1997). Suite à une spinalisation à T13, les chats peuvent récupérer la marche suite à l'entraînement mais une hyperflexion de la hanche et du genou est présente dans le membre neurectomisé pendant la phase de balancement. Le membre controlatéral ne présentant pas d'hyperflexion la locomotion devient asymétrique et ce déficit ne peut être récupéré. En somme, les changements déclenchés par une telle lésion s'effectuent en partie dans les systèmes supraspinaux et en partie au niveau de la moelle épinière. Si par contre, la lésion est effectuée après que le chat soit spinalisé et qu'il ait récupéré la marche, il n'y aura pas d'hyperflexion du membre dénervé. Le chat ne pourra cependant pas récupérer une amplitude normale de flexion de la cheville.

Dans une autre série d'expériences, une section du nerf allant à l'extenseur de la cheville (le nerf gastrocnemius lateral-soleus; LGS) a été effectuée unilatéralement chez 3 chats spinaux chroniques ayant récupéré la locomotion (Bouyer et al., 2001). Après la neurectomie, une augmentation de la flexion de la cheville au cours de la phase d'acceptation du poids (E1; yield) est observée pendant les premiers jours, et l'activité du muscle agoniste gastrocnemius médian est amplifiée. Une semaine après la lésion, la

flexion de la cheville au cours de la phase E1 était retournée à la normale, mais l'activité du gastrocnemius médian demeurait élevée. Donc, même en l'absence des voies descendantes, la moelle épinière a un potentiel important de plasticité et peut s'adapter à des lésions de nerfs musculaires en l'absence d'afférence supraspinale.

### **Lésion cutanée**

Les expériences de Bouyer et Rossignol suggèrent qu'une plasticité similaire a lieu suite à des lésions cutanées. Des dénervations cutanées bilatérales ont été effectuées chez des chats intacts (Bouyer et Rossignol, 2003a). Les chats compensaient rapidement pour cette dénervation au cours de la locomotion, malgré l'augmentation d'amplitude des fléchisseurs du genou (St) ainsi qu'un raccourcissement mineur du cycle de marche. Cependant, ils étaient incapables de marcher correctement sur une échelle horizontale pendant plusieurs semaines. Une fois cette habileté récupérée, une spinalisation au niveau T13 a été effectuée. Ces chats spinaux neurectomisés étaient incapables de marcher avec des contacts plantigrades, contactant plutôt le tapis roulant avec la surface dorsale du pied. Ce déficit n'a jamais été récupéré, même après plusieurs semaines d'entraînement. Dans une autre série d'expériences, le chat a d'abord été spinalisé et a récupéré la marche sur tapis roulant (Bouyer et Rossignol, 2003b). Une dénervation d'une des pattes postérieures a été effectuée graduellement, un nerf à la fois, et le chat a pu récupérer la locomotion entre les lésions successives. Mais lorsque le dernier nerf a été coupé, le chat ne pouvait plus poser sa patte correctement sur le tapis roulant au cours de la locomotion et ce déficit était permanent. Ainsi, bien que les inputs cutanés sont cruciaux pour la bonne expression de la locomotion spinale, les chats spinaux peuvent exprimer le patron locomoteur de façon optimale même avec une information sensorielle réduite (un seul nerf cutané restant). Ces études suggèrent que les circuits spinaux locomoteurs ne sont pas identiques avant et après la spinalisation, mais que même en absence d'influx supraspinal, une remarquable capacité d'adaptation est observée dans la moelle épinière.

### **Plasticité neurochimique**

Comme dit précédemment, le système noradrénergique est très important pour la locomotion chez les chats intacts, mais ne semble pas essentiel après spinalisation, lorsque

le chat a récupéré la locomotion sur tapis roulant. Cette réorganisation de l'équilibre entre les différents neurotransmetteurs suite à une lésion de la moelle épinière est nécessaire pour que la récupération et l'expression de la locomotion spinale deviennent principalement dépendantes de neurotransmetteurs endogènes à la moelle, comme le glutamate, l'acétylcholine et possiblement aussi des neuropeptides. Ce nouvel équilibre est en grande partie due au changement dans l'expression et la distribution des récepteurs après une lésion spinale.

La distribution laminaire et segmentaire des récepteurs monoaminergiques et des récepteurs AMPA a été comparée dans la moelle épinière de chats intacts, spinaux de courte durée (1 à 4 semaines post-spinalisation) et spinaux de longue durée (plus de 3 mois ; Giroux et al., 1999; Chau et al., 2001). Les récepteurs noradrénergiques alpha-1 et alpha-2 de même que les récepteurs sérotoninergiques 5-HT1A sont régulés à la hausse dans le premier mois après la lésion, puis leur niveau retourne au niveau contrôle. Cette hausse transitoire des récepteurs est principalement observée dans les laminae II-IV de même que la lamina IX (alpha-1) et lamina X (alpha-2 et 5-HT1A). Au niveau segmentaire, les récepteurs alpha-2 augmentent particulièrement dans les segments lombaires L3-L5, alors qu'ils diminuent dans les segments plus caudaux que L7. Les récepteurs au glutamate (AMPA) sont aussi régulés à la hausse, mais contrairement aux récepteurs noradrénergiques et sérotoninergiques, leur expression demeure élevée même chez les chats spinaux de longue durée. Ces changements dans l'expression des récepteurs corroborent fort bien l'efficacité des voies noradrénergiques à induire la locomotion chez les chats spinaux de courte durée, de même que l'importance des voies glutamatergiques dans la récupération de la locomotion.

*Étant donné que les chats utilisés dans cette étude ont été spinalisés de 1 à 5 semaines avant l'expérience, l'utilisation de la clonidine en combinaison de la stimulation électrique devrait être efficace pour évoquer la locomotion bilatérale.*

### **Plasticité des voies synaptiques**

Les précédentes sections mettent en évidence des changements plastiques se produisant au niveau de la moelle épinière. Ces changements se feraient au niveau des voies intraspinales et certains mécanismes de plasticité ont été suggérés pour expliquer ces

changements. Notamment, en ce qui a trait à la récupération locomotrice après spinalisation, l'entraînement locomoteur modifierait la transmission dans les afférences cutanées, nécessaires pour un placement du pied adéquat, ainsi que dans les afférences Ia et Ib des extenseurs (Côté et Gossard, 2004; Côté et al., 2003). Dans ce dernier cas, les auteurs ont postulé que pendant l'entraînement à la marche sur tapis roulant, les stimulations répétées des voies Ib permettant le support de poids du chat pourraient modifier la transmission dans ces voies. Ainsi, 2 groupes de chats spinalisés de 3 à 5 semaines avant l'expérience ont été comparés. Dans un groupe, les chats sont entraînés à marcher sur tapis roulant jusqu'à ce qu'ils puissent supporter leur poids (groupe entraîné) et dans l'autre groupe, les chats n'étaient pas entraînés (groupe contrôle). Au cours d'expériences aigues en locomotion fictive, l'amplitude des réponses évoquées dans les motoneurones extenseurs par la stimulation des voies afférentes du groupe I (Ia et Ib), a été mesurée avant et après injection de clonidine. L'effet de l'entraînement était plus important après clonidine, alors que l'inhibition disynaptique via les afférences Ib était significativement diminuée dans les deux groupes, mais surtout au niveau du groupe entraîné. De même, l'inversement de l'inhibition disynaptique Ib en excitation polysynaptique du muscle homonyme (discuté dans une précédente section) était plus fréquemment observé chez les chats du groupe entraîné. En somme, ces changements suggèrent un meilleur recrutement des muscles extenseurs et pourraient expliquer la récupération du support de poids observée avec l'entraînement

*Les groupes de chats utilisés dans cette étude sont similaires aux groupes utilisés dans la notre. On pourrait donc s'attendre à observer des différences entre la locomotion induite par stimulation intraspinale chez les chats spinaux de 1 semaine vs 5 semaines.*

### **Formation de nouvelles connections**

Plusieurs changements plastiques d'origine biochimique et synaptique, ont donc lieu au niveau des voies existantes et pourraient expliquer les changements adaptatifs observés chez les chats spinaux. Une partie de ces changements pourraient aussi être due à la formation de nouvelles voies synaptiques. Après lésions périphériques, un bourgeonnement collatéral des fibres lésées chez les rats et les chats est observé (Zhang et al., 1995; Koerber et al., 1994; Woolf et al., 1992; Woolf et al., 1995)

De plus, une lésion du système nerveux central peut entraîner un bourgeonnement dans des voies intactes (réinnervation réactive; Goldberger et Murray, 1988). Par exemple, la lésion de voies descendantes induirait une diminution des afférences synaptiques que reçoivent les interneurones spinaux. Un bourgeonnement de voies non-lésées, comme les afférences primaires par exemple, pourraient rétablir les afférences reçues par un neurone à un niveau 'normal'. Bien que la fonction demeure altérée, car seule une régénération des voies lésées permettrait de la rétablir complètement, elle pourra tout de même être restaurée en partie (Goldberger et Murray, 1988). Cette hypothèse a été mise en évidence par Helgren et Goldberger (1993), au cours d'expériences sur des chats adultes ayant subi une hémisection latérale de la moelle épinière et dont l'évolution de la récupération fonctionnelle a été étudiée jusqu'à 53 jours post-lésion. Ces chats présentent une diminution ipsilatérale permanente des projections sérotoninergiques sous le niveau de la lésion, mais une augmentation des afférences primaires au niveau de la corne dorsale. Ce mécanisme pourrait aussi intervenir suite à une section complète de la moelle épinière et permettrait d'expliquer la récupération de la locomotion observée suite à l'entraînement, ainsi que la régulation à la hausse permanente des récepteurs au glutamate AMPA (neurotransmetteur utilisé par les afférences primaires). De même, certaines évidences suggèrent qu'après rhizotomie dorsale, un bourgeonnement serait possible au niveau des interneurones de la corne dorsale, notamment dans les interneurones contenant de la substance P (Tessler et al., 1981; Tessler et al., 1984). On pourrait donc émettre l'hypothèse que, suite à l'interruption des connections supraspinales, les axones des interneurones propriospinaux (intacts) ou ascendants (interrompue) des segments lombaires pourraient eux aussi bourgeonner et établir de nouvelles connections. Cependant aucune donnée n'existe sur ce sujet.

*Ainsi, ces mécanismes de bourgeonnement pourraient expliquer en partie certaines différences dans les réponses évoquées chez le chat spinal d'une semaine et chez le chat spinal entraîné de 3 à 5 semaines.*

## Neuroprothèses

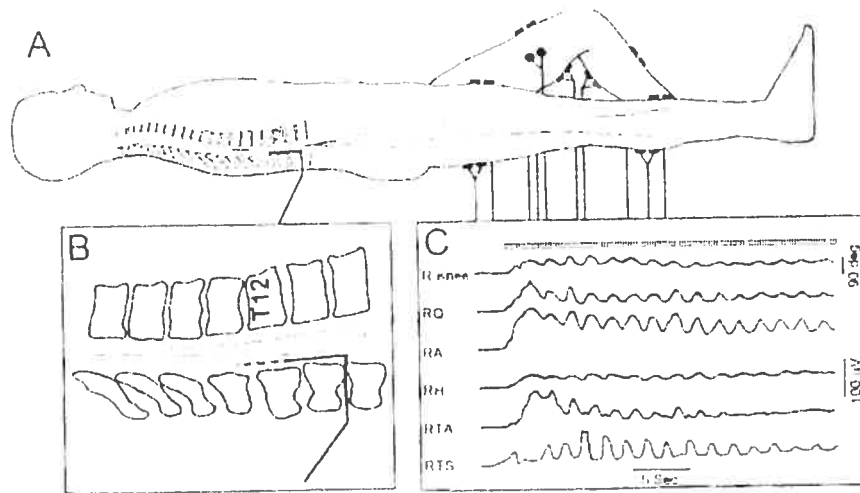
Le générateur de patron central peut donc être activé par les afférences périphériques (sur tapis roulant par exemple) et aussi par la stimulation pharmacologique

chez un chat spinal. Peut-il aussi être activé par la stimulation électrique? La question se pose à l'heure actuelle, et est d'autant plus pertinente que les neuroprothèses gagnent en popularité et en efficacité. Deux types de neuroprothèses sont en pleine expansion. La première consiste en un dispositif permettant l'enregistrement et l'analyse de l'activité neuronale pour contrôler artificiellement un dispositif externe. Des progrès fulgurants sont faits dans ce domaine et l'utilisation d'une telle neuroprothèse au niveau du cortex pour contrôler un curseur à l'écran ou un bras robotisé a été démontré chez le singe et chez le rat (Taylor et al., 2002 ; Chapin et al., 1999 ; Schwartz, 2004 ; Nicolelis, 2001). L'autre type d'interface utilise des signaux électriques pour stimuler le tissu nerveux et transmettre un type particulier d'information sensorielle ou mimer une fonction neurologiques. Un exemple de ce type d'interface serait l'implant cochléaire, qui stimule le nerf auditif pour augmenter l'acuité auditive des patients. De plus, la stimulation électrique des colonnes dorsales est utilisée pour contrôler la douleur et la spasticité.

En ce qui a trait à la réadaptation de la locomotion après une lésion du système nerveux central, la stimulation électrique neurofonctionnelle est utilisée depuis longtemps pour stimuler le nerf péronier commun qui innerve les fléchisseurs de la cheville et prévient le pied tombant (Liberson et al., 1961; Barbeau et al., 1999). Ce type de stimulation est notamment utilisé lors de problèmes restreints à une articulation, mais aussi pour réadapter des fonctions plus complexes, comme la locomotion chez les patients blessés médullaires. Entre autres, l'activation électrique séquentielle des différents muscles ou nerfs des membres inférieurs, à l'aide d'électrodes de surface ou sous-cutanées, permet d'induire un patron d'activation qui ressemble à celui de la locomotion. Cependant, une limite importante de cette approche est qu'elle nécessite un grand nombre d'électrodes afin d'activer chacun des groupes musculaires requis pour cette activité (Stein et Mushahwar, 2005; Prochazka et al., 2001). De plus, les fortes contractions musculaires obtenues par ces stimulations évoquent un patron locomoteur brusque et saccadé, tel un robot. Pour contrecarrer ces effets négatifs, une stimulation plus centrale, au niveau de la moelle épinière pourrait être bénéfique. En effet, basé sur les notions de voies synaptiques spinales, il serait possible d'activer des synergies complexes d'un membre postérieur sans avoir à stimuler chacun des groupes musculaires qui le composent (Stein et Mushahwar, 2005). Il serait même envisageable d'activer directement le réseau locomoteur spinal et ainsi de déclencher le patron locomoteur complet à l'aide d'un seul site de stimulation.

## Stimulation épidurale

La stimulation épidurale consiste à stimuler les structures postérieures (dorsales) de la moelle épinière via des électrodes placées sur la dure-mère, dans l'espace épidural. C'est la méthode la plus répandue de stimulation électrique spinale actuellement et elle s'est avérée efficace pour contrer les signes et symptômes de plusieurs maladies du système nerveux central. Elle est utilisée comme approche thérapeutique contre la douleur de patients (He et al., 1994; Barolat, 2000), dans le contrôle de la spasticité (Maiman et al., 1987; Koulousakis et al., 1987; Pinter et al., 2000; Richardson et McLone, 1978) ainsi que dans l'activation des extenseurs du genou au cours des transferts assis à debout et le maintien de la station debout (Jilge et al., 2004). Cette approche est aussi utilisée pour activer des patrons locomoteurs dans les membres postérieurs chez des patients ayant une lésion spinale partielle (Carhart et al., 2004; Herman et al., 2002) et/ou cliniquement complète (Shapkova et Schomburg, 2001; Dimitrijevic et al., 1998). Chez les patients paraplégiques, la stimulation des segments rostraux L1 à L3 près de la ligne médiane permet d'évoquer un patron rythmique et alterné des membres postérieurs (Dimitrijevic et al., 1998). La stimulation tonique entre 25 et 50 Hz est privilégiée pour cette stimulation afin de remplacer l'input tonique en provenance des centres supraspinaux (Dimitrijevic et al., 1998). Tel qu'exposé précédemment, cette plage de fréquence était aussi utilisée pour induire la locomotion par la stimulation de la MLR (Shik, 1983). Au cours de la stimulation épidurale, les patients sont couchés sur le dos (Figure 6) et l'induction de la locomotion suit un ordre de recrutement musculaire bien précis (Figure 7) (Dimitrijevic et al., 1998; Gerasimenko et al., 2002). À basse intensité, des réponses sont observées dans les muscles quadriceps (QA) et adducteurs (AD). À 4 V, l'activité de ces muscles augmente et une bouffée EMG apparaît dans les muscles ischiojambiers (HA ; St, Sm, Biceps fémoral). À 4.5 V il y a une activation tonique des muscles TA et GL. Lorsque l'intensité atteint 5V, l'activité tonique de ces muscles change en activité rythmique et, à 5.5V, un patron EMG rythmique bilatéral et alterné, similaire au patron locomoteur, est établi. Les membres inférieurs du patient alternent alors entre la flexion et l'extension. Ce patron d'activation est reproductible car il a été observé à de nombreuses reprises chez plusieurs patients.

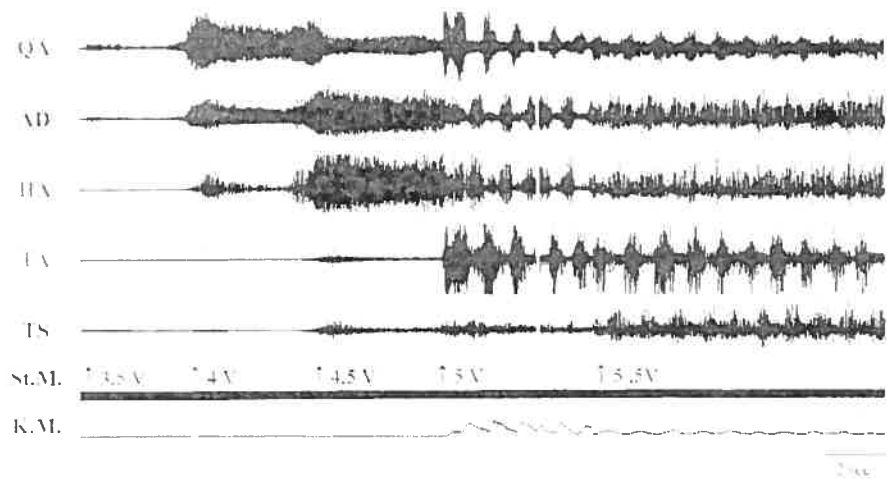


**Figure 6. Montage expérimental de la stimulation épidurale chez l'humain**

A. Le sujet repose sur le dos et l'électrode épidurale est insérée au-dessus de la moelle lombaire. Des paires d'électrodes de surface sont placées au niveau de différents muscles de la jambe pour enregistrer le signal EMG. B. diagramme de l'électrode épidurale quadripolaire placée au niveau du canal vertébral, au dessus des structures postérieures de la moelle épinière lombaire. C. Enregistrements EMG de l'activité rythmique du membre inférieur droit pendant la stimulation des segments lombaires rostraux. Le tracé supérieur (R Knee) représente le mouvement enregistré au genou pendant la flexion et l'extension du membre.

(Reproduit de Dimitrijevic et al., 1998)





**Figure 7. EMG de l'activité locomotrice chez un sujet paraplégique lors d'une stimulation épidurale**

Enregistrements EMG effectués dans le membre inférieur droit et venant du quadriceps (QA), des adducteurs (AD), des ischio-jambiers (HA), du tibial antérieur (TA) et du triceps surae (TS). Les mouvements de flexion/extension sont enregistrés avec un détecteur de position du membre inférieur droit (K.M.). L'enregistrement illustre l'effet d'une augmentation progressive de l'intensité du stimulus (St.M.) de 3.5 à 5.5 V avec une stimulation de 30 Hz appliquée au dessus des structures postérieures de L2. L'output EMG tonique est remplacé par un patron locomoteur à approximativement 0.7 cycle/s lorsque l'intensité de la stimulation atteint 5 et 5.5 V.

(Reproduit de Dimitrijevic et al., 1998)

Bien que l'utilisation de cette technique soit déjà utilisée en clinique, plusieurs études utilisant des modèles animaux ont été entreprises afin de déterminer les paramètres optimaux de la stimulation épidurale, en caractériser les effets et en déterminer les mécanismes. Ainsi, la stimulation épidurale de faible intensité (40-280 $\mu$ A) et à basse fréquence (0.5-10 Hz) le long de la ligne médiane peut évoquer une activité locomotrice chez des chats décérébrés (Iwahara et al., 1991b; Gerasimenko et al., 2005). Après spinalisation aigue à T7 (Iwahara et al., 1991b) ou à T10-T12 (Gerasimenko et al., 2003), la locomotion peut de nouveau être évoquée par une stimulation épidurale à la même fréquence ou à une fréquence plus élevée (20-35 Hz) (Gerasimenko et al., 2003). La localisation optimale des électrodes diffère selon les études. Iwahara et coll. (1991b) ont montré qu'une stimulation aux niveaux L1 à L4 est aussi efficace qu'aux niveaux L5 à S1, alors que Gerasimenko et coll. (2005) soutiennent que seule la stimulation appliquée aux segments L3 et L5 peut induire la locomotion chez tous les chats testés.

La stimulation épidurale activerait le générateur central de la locomotion essentiellement par des mécanismes intraspinaux. En effet, elle peut évoquer la locomotion fictive dans une préparation de chat spinal paralysé (Iwahara et al., 1991b). Ainsi les signaux phasiques des afférences périphériques ne seraient pas essentiels pour induire la locomotion mais joueraient tout de même un rôle prépondérant dans l'induction et la modulation de cette locomotion. Des expériences de stimulation épidurale chez le rat montrent que l'activité locomotrice bilatérale des membres postérieurs peut être évoquée uniquement si l'animal supporte une partie de son poids (Ichiyama et al., 2005). En absence de support de poids, par exemple dans les airs ou si les pattes ne font qu'effleurer le tapis roulant, la locomotion ne peut être induite.

Plusieurs études ont tenté de déterminer les voies activées par la stimulation épidurale pour induire un patron locomoteur. Suite à une lésion bilatérale des colonnes dorsales au niveau L6-L7 ou à une lésion du funicule dorsolatéral au niveau L5-L6, la locomotion induite par stimulation épidurale serait abolie (Gerasimenko et al., 2003). Les voies propriospinales des funicules dorsaux et dorsolatéraux sembleraient donc impliquées dans la locomotion induite. Cependant, plusieurs études théoriques basées sur la position dorsomédiane des électrodes épidurales (Coburn, 1985; Struijk et al., 1993; Rattay et al., 2000) suggèrent une activation prépondérante des racines dorsales. L'entrée des racines

dorsales dans la moelle épinière constituerait une position-clé, car elle correspondrait au site où le seuil d'activation de la locomotion serait le plus bas. À l'heure actuelle, cette hypothèse semble rallier la majorité des chercheurs travaillant sur la stimulation épidurale (Ichiyama et al., 2005; Dimitrijevic et al., 1998). Mais si la stimulation épidurale active les afférences des racines dorsales pour induire la locomotion, est-ce qu'une stimulation directe de la racine dorsale est aussi efficace?

### **Stimulation des racines dorsales**

Plusieurs études ont démontré qu'une stimulation électrique des racines dorsales lombaires et sacrées peut induire un rythme locomoteur bilatéral dans les membres postérieurs. En effet, la stimulation unilatérale de la racine dorsale L7 ou S1 à très basse fréquence (en général 1.5 à 2 trains/s) peut induire la locomotion bilatérale sur tapis roulant chez un chat décérébré (Budakova, 1971). Cette locomotion est abolie suite à une spinalisation aiguë, mais peut être ré-exprimée suite à l'injection de L-DOPA. De plus, Grillner et Zangger (1979) ont démontré que la stimulation unilatérale ou bilatérale des racines dorsales L6, mais aussi L5 et L7, peut déclencher la locomotion chez des chats spinaux aigus et chroniques (3 à 6 mois) ayant reçu de la nialamide (inhibiteur de la monoamine oxydase) et de la L-DOPA. La fréquence optimale pour induire la locomotion était en général de 30 à 50 Hz mais pouvait être plus basse, allant jusqu'à 6 Hz pour les chats spinaux chroniques. Le rythme locomoteur pouvait être induit en absence d'inputs sensoriels (suite à une déafférentation et en locomotion fictive) et était influencé par l'intensité de la stimulation et, dans une moindre mesure, par la fréquence de stimulation. Ces résultats ont été confirmés dans une préparation de rat néonatal in vitro (Marchetti et al., 2001). En effet, la stimulation unilatérale de la racine dorsale L5 a pu induire un patron locomoteur bilatéral et ce, sans apport pharmacologique.

En somme, en plus de réinitialiser le rythme et de moduler le patron locomoteur, l'activation des afférences sensorielles pourrait induire la locomotion par stimulation directe des voies afférentes projetant au niveau des différentes régions de la moelle épinière. De même, ce mécanisme pourrait être impliqué dans la locomotion induite par stimulation intraspinale que nous avons étudiée dans cette thèse.

***Pour tenter de répondre directement à la question, nous avons appliqué une stimulation électrique intraspinale et une stimulation électrique de la racine dorsale dans***

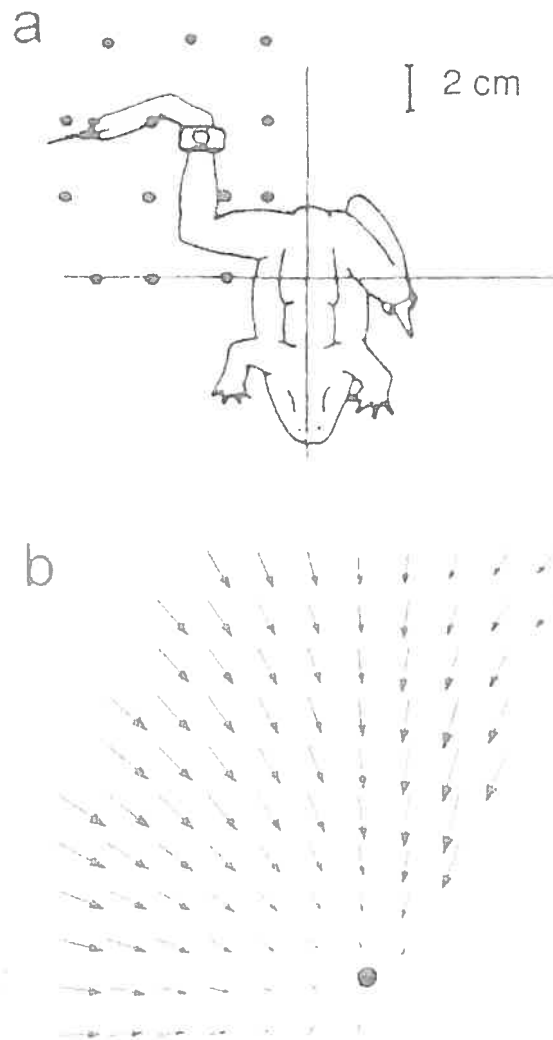
*une même préparation, et au même segment. Nous pourrions ainsi comparer les réponses induites avec les deux méthodes de stimulation ainsi que les caractéristiques de la locomotion induite.*

## **Stimulation intraspinale**

### **Primitives**

La stimulation électrique intraspinale a été principalement utilisée comme outil d'étude de l'organisation motrice de la moelle épinière. D'ailleurs, au cours de nos travaux, nous avons mis en évidence une 'carte' des réponses motrices des membres postérieurs, dans le renflement lombosacré. L'une des premières topographies de la moelle épinière à l'aide de la stimulation électrique intraspinale a été faite par Bizzi et collaborateurs au cours d'expériences chez la grenouille. Dans ces expériences, la patte postérieure de la grenouille est placée dans une position précise et prédéterminée dans l'espace de travail (Figure 8) (Giszter et al., 1993). La stimulation d'un site au niveau de la moelle épinière évoque une réponse isométrique dont la direction et l'amplitude de la force sont enregistrées au niveau de la cheville, ce qui constitue un vecteur de force.

Puis, la stimulation de ce site spinal était répétée en déplaçant la patte à l'une des 9 ou 16 positions testées. Les vecteurs de force évoqués par la stimulation d'un même site spinal variaient selon la position de la patte. Ainsi, l'ensemble des vecteurs de force évoqués par la stimulation d'un même site spinal lorsque la patte est placée dans ces différentes positions, résulte en un champ qui est convergent. De plus, les vecteurs de ce champ convergent vers un seul point d'équilibre, i.e. un point où la jambe serait dans un état stable si elle pouvait bouger librement. Ils ont répété ce protocole de stimulation à différents sites de la moelle épinière et, malgré la variation des sites stimulés et des positions de la patte, très peu de réponses motrices différentes étaient évoquées. De plus, les champs induits par cette activation focale de la moelle épinière peuvent être additionnées vectoriellement.



**Figure 8. Champs de force évoqués par la microstimulation des régions interneuronales de la moelle épinière de grenouille**

a, La cheville de la grenouille spinalisée est attaché à un transducteur de force et fixée à différentes localisations dans l'espace de travail de la jambe, indiqué par les cercles pleins dans la figure. Le même site dans la moelle épinière est stimulé avec la cheville à chaque localisation, et la force résultante isométrique était mesurée. En b, exemple d'un champ de force résultant d'une stimulation à l'un de ces sites dans la moelle épinière. (Reproduit de Bizzi et al., 1991)

De ces expériences est née la théorie des réponses primitives: la moelle épinière comprendrait un nombre limité de réponses motrices stéréotypées qui constitueraient les modules de base pour des mouvements plus complexes. Selon cette hypothèse, les mouvements et la posture seraient basés sur la sommation vectorielle de ces réponses primitives. Une telle organisation modulaire de la moelle épinière de la grenouille a été confirmée par des études d'enregistrement des réponses de force à la cheville suite à l'injection par iontophorèse de NMDA (Saltiel et al., 1998). De plus, les résultats de la stimulation électrique de la moelle épinière de rat (Tresch et Bizzi, 1999) et de chat (Lemay et Grill, 2004) ont confirmé les observations chez la grenouille et validé une telle distribution chez les mammifères. Cependant un parallèle est difficile à faire entre cette organisation modulaire et les connaissances accumulées sur les interneurons spinaux qui pourraient médier ces mouvements.

L'étude de Lemay et Grill (Lemay et Grill, 2004) a abordé ce point et, en plus de confirmer la théorie des primitives décrites chez la grenouille et le rat, ils ont tenté de déterminer la distribution laminaire des réponses évoquées par la stimulation électrique. Ils ont aussi corrélié les réponses évoquées et les éléments nerveux qui pourraient être activés, montrant un lien entre les laminae recevant l'input des différentes afférences sensorielles et certaines des réponses évoquées.

D'autres études ont aussi tenté d'établir un rapprochement entre les forces évoquées par la microstimulation intraspinale et les neurones ou les voies réflexes activés. Ainsi, Mushahwar et coll. (2004) ont enregistré les vecteurs de force terminaux (endpoint) évoqués par la microstimulation de la moelle épinière de chat dans trois conditions différentes : anesthésié, décérébré et spinal. Chez le chat anesthésié, la direction des vecteurs de force de la zone intermédiaire était corrélée à la distribution anatomique des noyaux moteurs se trouvant dans le segment stimulé. Ces travaux ont aussi mis en évidence l'influence de l'état d'excitabilité de la moelle épinière sur les vecteurs de force enregistrés. En effet, un changement important dans la direction des vecteurs est observé lors de la stimulation intraspinale chez un chat anesthésié, décérébré puis spinalisé : presque tous les points stimulés dans la matière grise intermédiaire et dorsale évoquaient un réflexe de flexion et les mouvements d'extension n'étaient évoqués qu'à haute intensité dans les noyaux moteurs extenseurs. Ils ont donc suggéré que les noyaux moteurs de la corne ventrale représentent une cible stable et idéale pour appliquer la stimulation intraspinale et

déclencher des mouvements précis après une lésion de la moelle épinière. Une combinaison de ces synergies permettrait d'évoquer un patron moteur ressemblant à la locomotion.

### **Contrôle artificiel de synergies motrices mimant la locomotion**

Une telle combinaison de synergies motrices évoquée par la stimulation intraspinale a été effectuée chez des chats spinaux chroniques. Dans ces expériences, une matrice d'électrodes (30 microélectrodes en tout ; 15 par côté) était implantée dans la moelle épinière près des noyaux moteurs de la corne ventrale. Ces électrodes sont regroupées en groupe fonctionnel de 4 électrodes individuelles où 2 électrodes évoquent une flexion et 2 autres une extension. La stimulation phasique d'un groupe donné, c'est-à-dire la stimulation des électrodes évoquant la flexion suivie de la stimulation des électrodes évoquant l'extension induit un patron locomoteur stable et contrôlé (Saigal et al., 2004).

Similairement, la stimulation simultanée de plusieurs sites spinaux pouvant induire des mouvements mimants la locomotion a été utilisée par Tai et coll. (2003). En premier lieu, un signal électrique sinusoïdal a été appliqué via une électrode, pour stimuler les différentes parties de la moelle épinière (dorsale, intermédiaire et ventrale) des segments L5 à S1 chez des chats anesthésiés. Quatre types de mouvements de la patte postérieure ont été répertoriés d'après le patron cinématique : soit la flexion, l'extension, l'abduction et l'adduction, et la distribution spinale de chacune de ces réponses a été établie. En stimulant un petit nombre de microélectrodes (minimum 2) placés de chaque côté de la moelle épinière, ils ont ainsi pu évoquer un patron de flexion/extension bilatéral et alterné, qui serait semblable au patron locomoteur.

*Les approches décrites dans cette section pourraient être une avenue intéressante pour la réadaptation mais aucune des études citées précédemment n'a montré que le patron locomoteur complet pouvait être déclenché par la stimulation intraspinale.*

### **Activation du réseau spinal locomoteur**

Tel que mentionné au début de cette introduction, Shik aurait mis en évidence une bande locomotrice qui prendrait naissance dans le tronc cérébral et se continue jusqu'à L1. La stimulation de cette bande chez les chats décérébrés évoque le patron complet de la locomotion des membres postérieurs (Kazhenikov et al., 1983). Chez le chat spinal Grillner et Zangger (1979) ont indiqué que la stimulation bipolaire des colonnes dorsales en

combinaison avec la L-DOPA pouvait induire la locomotion. Ces résultats ont été reproduits par Gerasimenko et coll. (2003), et ce sans agent pharmacologique. À ma connaissance, la seule étude ayant vraiment décrit une locomotion bilatérale et alternée évoquée par une stimulation intraspinale via une électrode a été effectuée sur une préparation de rat néonatal in vitro avec tronc cérébral attaché (0-4 jours post-nataux) (Iwahara et al., 1991a). Différents paramètres de stimulation ont été testés, notamment la localisation optimale de la stimulation aux différents segments (L1 à S1), différentes latéralités et différentes profondeurs. Une stimulation appliquée à basse fréquence (0.5-4Hz) au niveau des colonnes dorsales ou du funicule ventral des segments L1 à L3 était optimale pour induire un patron locomoteur, lorsque appliquée près de la ligne médiane. De plus, une spinalisation aigue au niveau thoracique moyen ou une rhizotomie bilatérale du renflement lombaire ne bloquait pas le rythme locomoteur.



## Projet de recherche

---

L'étude décrite précédemment chez le rat néonatal est un pas important vers l'utilisation de la microstimulation pour induire la locomotion. Cette technique pourrait évoluer vers une approche thérapeutique intéressante pour assister à la récupération de la marche chez des patients paraplégiques, mais il y a encore trop peu de données sur ce sujet. Entre autres, les mécanismes ne sont pas connus et l'effet d'une telle stimulation sur une préparation marchante n'a toujours pas été démontré.

Ainsi le premier objectif de cette thèse, sera de déterminer les paramètres optimaux de stimulation pouvant évoquer la locomotion chez un chat spinal. D'abord la localisation des sites pouvant évoquer la locomotion devra être déterminée, car elle varie dans la littérature. Dans l'axe rostro-caudal, certaines études suggèrent que la stimulation des segments rostraux L4-L5 (Gerasimenko et al., 2003, 2005) seraient les plus efficaces alors que d'autres ne semblent avoir trouvé aucune différence dans l'efficacité à induire la locomotion entre les segments L1-L4 et L5-S1 (Iwahara et al., 1991). Dans l'axe dorsoventral, certains préconisent une stimulation des parties ventrales car les réponses évoquées seraient plus stables (Mushahwar et al., 2004), d'autres ont démontré l'efficacité de la stimulation des parties dorsales (Grillner et Zangger, 1979 ; Iwahara et al., 1991 ; Gerasimenko et al., 2003, 2005) et d'autres encore montrent que les deux loci peuvent évoquer une activité locomotrice (Iwahara et al., 1991). Du point de vue de l'axe médio-latéral, presque toutes ces études soulignent que les régions près de la ligne médiane sont efficaces.

Nous avons donc entrepris de déterminer les **localisations de stimulation** qui seraient optimales dans ces trois axes pour évoquer la locomotion chez des chats spinaux à T13. Dans une première étude (chapitre 2), la stimulation électrique sera appliquée systématiquement via une seule électrode de Tungstène au niveau des segments L3 à L7, de la surface dorsale à la surface ventrale, et de la ligne médiane à 3 mm latéralement. Nous avons ainsi pu dégager une carte topographique des sites évoquant la locomotion bilatérale, mais aussi des sites évoquant des réponses ipsilatérales (de flexion, d'extension et de flexion suivi d'extension), des réponses bilatérales (flexion et extension bilatérales, réponses bilatérales croisées) ainsi que des réponses locomotrices unilatérales (locomotion

ipsilatérale et locomotion contralatérale). Les enregistrements cinématiques et EMG des mouvements induits permettront de faire un parallèle entre ces réponses et la localisation des neurones impliqués dans certains réflexes décrits précédemment. Un tel parallèle est plus difficile à faire avec les enregistrements de vecteur de force, utilisé dans d'autres études. Nous avons effectué ces expériences chez des chats spinaux d'une semaine avant et après l'injection de clonidine ainsi que chez des chats ayant récupéré la locomotion. On pourrait s'attendre à un changement au niveau de cette carte de réponses après l'entraînement. Les résultats de cette étude sont présentés dans le chapitre 2. Une étude adoptant un tel point de vue fonctionnel et locomoteur n'avait jamais été faite auparavant.

Puis, dans une optique d'application thérapeutique, nous avons déterminé les **paramètres optimaux de stimulation** permettant d'évoquer une activité locomotrice : le type (tonique ou par train), l'intensité et la fréquence optimale de stimulation intraspinale. De plus, nous avons comparé la locomotion induite par la stimulation intraspinale à la locomotion contrôle c'est-à-dire, celle évoquée après injection de clonidine et stimulation périnéale. Ainsi, nous avons pu détailler plusieurs caractéristiques : Peut-on modifier le rythme ou le patron locomoteur ? Y a-t-il une corrélation entre le patron locomoteur et la localisation spinale de la stimulation qui l'a induite ? Une analyse des **caractéristiques de la locomotion** pourrait nous renseigner sur les voies activées par la stimulation électrique.

Finalement, une étude sur les **mécanismes** permettant l'induction de la locomotion a été effectuée (chapitre 3 également). Comme il a été suggéré pour la stimulation épidurale, nous avons étudié le rôle des afférences de la racine dorsale dans l'induction de la locomotion par stimulation intraspinale. De plus, des éléments importants pour le déclenchement de la locomotion spinale seraient situés dans les segments lombaires moyens L3-L4. Nous voulons donc déterminer si ces segments sont essentiels pour la locomotion induite par la stimulation intraspinale des niveaux plus caudaux.

Une étude de caractérisation et de recherche des mécanismes locomoteurs induit par stimulation électrique intraspinale n'avait jamais été entreprise auparavant. Cette contribution importante et originale pourrait avoir une portée certaine dans la compréhension de l'organisation motrice de la moelle épinière, des mécanismes en jeu dans l'induction de cette locomotion et aussi, nous l'espérons, dans la compréhension des possibilités mais aussi des limites de la stimulation électrique intraspinale en tant qu'approche thérapeutique.

## CHAPITRE II - ARTICLE #1

---

### **Non-locomotor and locomotor hindlimb responses evoked by electrical microstimulation of the lumbar cord in spinalized cats**

**By**

***Dorothy Barthélemy, Hugues Leblond, Janyne Provencher, Serge Rossignol***

Groupe de recherche sur le système nerveux central,  
Département de Physiologie, Pavillon Paul-G.-Desmarais, Université de Montréal,  
Montréal (Québec), Canada H3T 1J4

Soumis à : Journal of Neurophysiology le 27 février 2006

**Non-locomotor and locomotor hindlimb responses evoked by electrical  
microstimulation of the lumbar cord in spinalized cats**

**By**

***Dorothy Barthélemy, Hugues Leblond, Janyne Provencher, Serge Rossignol***

Groupe de recherche sur le système nerveux central,  
Département de Physiologie, Pavillon Paul-G.-Desmarais, Université de Montréal,  
Montréal (Québec), Canada H3T 1J4

Soumis à : Journal of Neurophysiology le 27 février 2006

## Abstract

As a first step to using intraspinal microstimulation (ISMS) for rehabilitation purposes we describe the distribution of the various types of hindlimb responses evoked by ISMS in chronically spinalized cats (T13). The effect of ISMS applied through a single electrode was assessed before and after an i.v. injection of clonidine (noradrenergic agonist) using kinematics and electromyographic recordings in untrained or trained spinal cats. ISMS was applied in the dorsal, intermediate and ventral areas of segments L3-L7, from midline to 3 mm laterally. ISMS triggered three main types of responses: ipsilateral and bilateral non-locomotor responses as well as rhythmical locomotor responses. In the untrained cat, ipsilateral and bilateral flexion were evoked throughout the cord in the dorsal region. Ipsilateral and bilateral extensions were mainly evoked ventrally in the caudal segments. Ipsilateral flexion followed by extension was triggered dorsally and ipsilateral flexion with contralateral extension (crossed extension reflex) was triggered ventrally and medially. Contralateral hindlimb locomotion was frequent and mainly evoked medially whereas bilateral locomotion was evoked almost exclusively from dorsal regions. Ipsilateral locomotion was rarely observed in these preparations. With some exceptions, distribution gradients were generally conserved in untrained and trained cats, pre or post-clonidine, but the proportion of each response types could vary. The distribution of ISMS-evoked responses is discussed as a function of known localization of interneurons and motoneurons.

**Keywords:** microstimulation, lumbosacral spinal cord, flexion, extension, locomotion, clonidine, locomotor training, motor responses, spinal cat

## Introduction

Studies in the spinal paralyzed cat, injected with the noradrenergic precursor L-DOPA, have shown that there is an autonomous spinal network in the lumbosacral cord capable of generating a bilateral and alternating hindlimb locomotor pattern, independent of supraspinal centers or peripheral afferents (Grillner and Zangger, 1979). This was also shown using  $\alpha 2$ -noradrenergic agonists such as clonidine, that could trigger locomotion on a treadmill in the acutely spinalized cat when perineal stimulation was used (Forssberg and Grillner, 1973; Barbeau and Rossignol, 1987; Chau and al., 1998a). Without pharmacological stimulation, hindlimb locomotion on the treadmill can be expressed several weeks after the complete spinal section with daily locomotor training on the treadmill (Barbeau and Rossignol, 1987; de Leon and al., 1998), but recovery of spontaneous spinal locomotion can be accelerated by noradrenergic stimulation (Chau and al., 1998a).

Could this spinal locomotor synergy be activated by electrical stimulation? Various studies suggest that it might be possible to use electrical stimulation of the spinal cord to evoke complex motor patterns such as locomotion. This might constitute an interesting approach in the context of rehabilitation after spinal cord injury. Indeed, electrical stimulation could be envisaged on the treadmill but also in an overground situation and used to couple hindlimb movements with the voluntary forelimb locomotor movements. However, if electrical stimulation is to be used, which sites of the spinal cord should be stimulated and how? Electrical stimulation of dorsal roots was shown to be efficient to induce locomotor activity in decerebrate and spinal cats (Budakova, 1971; Grillner and Zangger, 1979) and in the *in vitro* neonatal rat (Marchetti et al., 2001). Epidural stimulation is also efficient in inducing locomotor rhythms in decerebrate and spinal cats (Iwahara et al., 1991b; Gerasimenko et al., 2003; Gerasimenko et al., 2005) and spinal rats (Iwahara et al., 1991a; Ichiyama et al., 2005). This approach is also promising in spinal cord injured patients where rhythmic activity could be evoked by epidural stimulation (Dimitrijevic et al., 1998; Minassian et al., 2004; Shapkova and Schomburg, 2001; Herman et al., 2002; Carhart et al., 2004). The optimal localization to induce locomotion with epidural stimulation differed between authors, however. In the spinal cat,

Iwahara et al (1991b) showed that segments L1 to L4 are as efficient as segments L5 to S1 to induce bilateral locomotion, while Gerasimenko et al. (2003), suggested that the border between L4 and L5 was the most efficient.

Intraspinal electrical microstimulation through microelectrodes was also used to generate movement of the hindlimbs. In the chronically spinalized frog and rat (Giszter et al., 1993; Tresch and Bizzi, 1999), stimulation with a single electrode in the gray matter of the spinal cord seems to suggest that premotor circuits (at interneuronal levels) are organized into a limited set of modules, each of them inducing a specific force field. Similar topographic organizations were obtained in decerebrate cats (Lemay and Grill, 2004; Tai et al., 2003; Mushahwar et al., 2004; Stein et al., 2002). However, to induce locomotion required stimulation of several sites of the spinal cord. Indeed several electrodes were placed near the motoneuronal pools of the hindlimb in the ventral horn at various segments to evoke bilateral locomotion in spinal cats (Saigal et al., 2004).

Bearing in mind that it would be advantageous to use a minimal number of implanted electrodes in the eventuality of chronic implants, we focused here on the use of a single electrode to evoke the full locomotor synergy instead of attempting to combine various more elemental sites of spinal stimulation. Further evidence suggesting this possibility was presented in a previous studies where intraspinal injection of clonidine restricted to the L3 or L4 segment could be sufficient to induce bilateral locomotion in spinal cats (Marcoux and Rossignol, 2000). Thus, if pharmacological stimulation of restricted regions of the cord can induce locomotion, it was reasoned that the same could also apply to microstimulation restricted to single spinal sites. We thus undertook to study systematically the various responses (locomotor and non-locomotor) evoked through stimulation of a single electrode at various spinal segments, lateralities and depths.

In this first paper, we aim at establishing the topographic organization of hindlimb responses and determining the best sites to evoke locomotion. Through a tungsten electrode, we applied trains of low current biphasic pulses ( $<100 \mu\text{A}$ ) from L3 to L7 at different depths and lateralities, thus stimulating both gray and white matter. Using kinematics and electromyographic techniques, we classified the responses obtained in three groups whether the responses involved one or both hindlimbs or had a rhythmic locomotor component. We report herein on the distribution of these responses before (pre) and after

(post) clonidine, in untrained spinal cats (1 week after spinalization) and trained spinal cats that have recovered locomotion on the treadmill (3-5 weeks). We found that locomotor responses as well as non-locomotor responses could be evoked throughout the cord but that each type of responses was preferentially triggered from specific parts of the spinal cord. Also, for each type of response, the spinal distribution of the effective sites in the rostrocaudal, mediolateral and dorsoventral axes did not vary greatly in the 4 conditions (untrained or trained, pre- or post-clonidine), but the proportion of their occurrence varied post-clonidine and with training. Part of those results have been published in abstract form (Barthélemy et al., 2002; Barthélemy et al., 2005a).



## Methods

Eighteen cats of either sex (3.2-5.4 kg) were used for this study. Thirteen of these cats were spinalized and were confined to their cage in the following 5-7 days that preceded the acute experiment. Since no difference in the results was observed between the 5- and 7-day spinal cats, they will be referred to as untrained spinal cats. The remaining 5 cats were pre-selected for training, spinalized and trained to walk on the treadmill (10 minutes, 3 times/day, 5 days/week) until they recovered spontaneous hindlimb locomotion on the treadmill i.e. three (n=2), four (n=1) and five weeks (n=2) before the acute experiment. Results from those five cats were similar and they will be referred to as trained spinal cats. All procedures were conducted according to the *Guide for the Care and Use of Experimental Animals* (Canada), using protocols approved by the Ethics Committee of Université de Montréal.

### Spinalization

All surgeries were performed in aseptic conditions and under general anesthesia. The cats received Buprenorphine 0.01 mg/kg s.c., one hour before the surgery. After a preoperative medication [acepromazine maleate (Atravet<sup>TM</sup>) 0.1mg/kg i.m., glycopyrrolate 0.01mg/kg i.m. and ketamine 10mg/kg i.m.], anesthesia was induced with isoflurane 2% in 95% O<sub>2</sub> by inhalation first through a mask, and then maintained through an endotracheal tube. A laminectomy was performed at the T13 vertebra. The dura was carefully opened and a few drops of xylocaine (2%) were applied on the surface of the spinal cord and then directly into the spinal cord with a 24 gauge needle at the T13 level on both sides. The spinal cord was severed completely with surgical scissors so that the ventral surface of the vertebral canal could be clearly visualized. Absorbable hemostat (Surgicel) was then used to completely fill up the space between the rostral and caudal ends of the spinal cord, thus providing haemostasis and insuring completeness of the section. Muscles, fascia and skin were then sutured in layers. For prolonged post-surgical analgesia, a patch of transdermal fentanyl (Duragesic\*25; 2.5 mg, 25 µg/h for 72 h) was sutured to the skin at the level of the sacrum. In some cases, a bladder catheter was inserted through the urethra and sutured to

the perineum. At the end of the surgery, an antibiotic Ayercilline 40,000 I.U./ kg, and an analgesic Anafen, 2mg/kg, s.c., were administered.

### **Postoperative cares**

After the surgery, the animal was placed in a heated incubator until it regained consciousness and expelled its endotracheal tube. It was then returned to its individual cage (104 x 76x 94 cm) lined with a foam mattress in addition to absorbent tissues and with ample food and water supplies. The animal was attended to at least twice daily for manual bladder expression (if no catheter was in place), for general inspection, and for cleaning of the hindquarters. Although analgesia for the first three postoperative days was provided by the fentanyl patch, buprenorphine was administered (0.01mg/kg, s.c. every 6 h) when needed. An antibiotic, Apo Cephalex, 100mg/day was given p.o. for 10 days or until the day of the acute experiment.

### **Acute experiments**

Under general anesthesia (as detailed above) one carotid artery was cannulated for monitoring blood pressure and the other one was ligated. One jugular vein was cannulated for the administration of fluid and medication. The temperature was measured with a rectal thermometer and maintained around 38°C by a feedback-controlled heating element using direct current and with heating lamps if necessary. The end-expiratory pCO<sub>2</sub> was monitored using a Datex Monitor during normal or assisted ventilation and maintained between 3.5 and 4.5%. Cats maintained their blood pressure within the normal range; in two cases Levophed was given to correct a low pressure. A laminectomy of L3 to L6 vertebrae exposed the spinal cord segments from L3 to S1 and the cat was then mounted on a spinal fixation unit over a motor-driven treadmill. To ensure stability for subsequent intraspinal electrical stimulation, the spine was fixed with three pairs of lateral pins: one pair on the L1 pedicles, one on those of L4 or L5 and the other just below the iliac crests. A precollicular, post-mamillary decerebration was performed with a spatula and the rostral nervous tissue was aspirated. Anesthesia was then discontinued. In some cases, assisted ventilation had to be used after decerebration. The dura was opened and the spinal cord

covered with warm mineral oil. The spinal segments were identified by the most rostral and caudal rootlets of each dorsal root.

### Experimental protocol

At least one hour elapsed between the cessation of anesthesia and the start of stimulation. First, locomotor capacity of all cats was evaluated on the treadmill at a speed of 0.2 m/s while using perineal and/or abdominal manual stimulation. In 8 out of 9 animals, motor responses evoked with ISMS were studied pre and post injection of clonidine (500  $\mu\text{g}/\text{kg}$  i.v.). In the remaining 9 cats, clonidine was injected before applying ISMS. Clonidine was used because noradrenergic agonists have been found to be the most efficient to initiate locomotion in spinal cats on a treadmill (Barbeau and Rossignol, 1991; Chau et al., 1998a; Forssberg and Grillner, 1973). In 5 cats, Naloxone was also injected i.v. (700  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) to potentiate the effects of clonidine (Pearson et al., 1992a). There was no difference between the results of cats that received clonidine only and those that received clonidine with naloxone.

### Stimulation

ISMS using a custom-designed stimulating software and a linear stimulus isolator unit (world precision instruments; model A395) was applied monopolarly to the spinal cord with a single tungsten electrode insulated except for the tip (around 1-2  $\mu\text{m}$ , impedance 0.08 to 0.1  $\text{M}\Omega$ ; in 5 cats, electrodes of 5-20  $\text{M}\Omega$  were used). The indifferent electrode was inserted into back muscles. Biphasic pulses (20-90  $\mu\text{A}$ , 250-300  $\mu\text{s}$ ) were delivered as trains of 100-200 ms duration with an intra-train frequency of 300Hz and a rate of 0.8 trains/s. The stimulation was applied one site at a time in different parts of the dorsal, lateral, and ventral areas of the L3 to L7 segments and from the midline to 2.5 or 3 mm on either side. The electrode was held in a microdrive and was mounted on a stereotaxic manipulandum with x and y coordinates and dorsoventral (where 0 is on the dorsal surface) and mediolateral displacement (where 0 is on the midline) could be determined and noted. Based on the distribution of the dorsal roots, we divided each segment in 4 parts (e.g.

Rostral L3, Mid L3, Caudal L3 and Junction L3-L4). At each stimulating entry point, we descended the electrode while the stimulation was continuously on, but stopped every 0.5 mm, as well as when the response changed, to assess the effects at that point. Therefore the responses illustrated for each point represent an average of several responses (around 10 stimulation trains). Stimulation tracks went from the dorsal surface to approximately 4-5 mm deep.

Fig.1 illustrates all sites (for all cats) that were stimulated in each of the 4 conditions tested by plotting the stimulation coordinates noted during the experiment. All stimulation sites for one segment are merged on one representative section of that segment (taken from the middle of each segment). The most ventral and lateral sites were less investigated due to experimental time constraints (see also methodological considerations in the Discussion).

Overall, the untrained spinal cat preparation was studied the most. As described in table 1, the responses described in this paper were evoked in 61 stimulation tracks made in 6 untrained spinal cats pre-clonidine, and in 210 tracks made in 12 untrained spinal cats post-clonidine. In each track, 4 to 5 different types of responses were observed successively. To assess stability of the responses, an average of 8-10 stimulation trains were tested for each response type. Results obtained in the untrained spinal cats will be compared to those obtained in trained spinal cats, from 36 stimulation tracks made in 3 cats pre-clonidine and 64 stimulation tracks made in 5 cats post-clonidine.

### **Recording and analysis**

To record electromyographic (EMG) activity, muscles were implanted percutaneously using a 21 gauge needle with pairs of enamel-insulated copper wires (32AWG), in the following muscles: Semitendinosus (St), knee flexor and hip extensor; Sartorius Anterior (Srt), hip flexor and knee extensor; Tibialis Anterior (TA), ankle flexor; Vastus Lateralis (VL), knee extensor; and Gastrocnemius Lateralis (GL), ankle extensor.

The EMG signals were differentially amplified with AC coupled amplifiers (bandwidth of 300 Hz to 10 kHz), and digitized at 1 kHz on a PC with a data acquisition board. The EMG recording was synchronized to the recorded video images by means of a digital Society for Motion Picture and Television Engineers time code (SMPTE). This time

code was recorded simultaneously on one digital channel as well as on the videotape. During locomotion, the onset and offset of the bursts of activity in muscles were detected automatically with a custom-designed software then verified and corrected manually when necessary.

For analysis of limb kinematics, reflective markers were placed on the bony landmarks of the left hindlimb: the iliac crest (the marker was thus on the lateral pin and fixed relative to the frame), the femoral head, the knee joint, the lateral malleolus, the metatarsophalangeal joint, and the tip of the fourth or fifth toe. Video images of the locomotor movements were captured by a NTSC camera (shutter speed 1/1000 s) at 30 frames/s and recorded on a video recorder (Panasonic AG 7350). Then, selected video sequences were digitized with a video grabber and the frames were de-interlaced yielding 60 fields per second with, therefore, a temporal resolution of 16.7 ms between fields. The X and Y coordinates of the different joint markers were then obtained. Angular displacement data and joint angles were then computed automatically (e.g. hip joint angle was calculated based on the relative position of the iliac, hip and knee markers). From both X-Y coordinates of the recorded markers, displacement data and the calculated joint angle data, displays of stick diagrams and trajectories were generated using custom-made software. Stick diagrams of responses consisted of reconstruction of the actual hindlimb movement during the stimulation.

To evaluate and classify the responses obtained, videos of all experiments were reviewed and the responses were classified based on the presence of motor response in one or both hindlimbs, and on the type of movement induced (be it flexion, extension or rhythmic locomotor movements). Though videos of experiments were only made of the left hindlimb, kinematics responses in the right hindlimb could still be seen. In the results, the ipsilateral hindlimb is located on the same side as the stimulation and the contralateral hindlimb is on the opposite side of the stimulation. For each response, the EMG data had to corroborate the kinematics evaluation, although sometimes stimulation induced a burst in all EMG channels recorded and kinematics became crucial. The verification of both sets of data was also particularly important when the response could be misinterpreted as being locomotion, such as ipsilateral flexion followed by a passive, treadmill-driven, extension of

the limb. The presence or absence of extensor muscle activity in the EMG could clearly differentiate the two.

### **Statistics**

Sites where different responses were evoked were compared with Student's *t*-test and were considered to be significant if the probability of  $\alpha$  type error was  $< 0.05$ .

### **Histology**

At the end of the experiments, electrolytic lesions (1-5 mA, anodic current: 15s; cathodic stimulation. However, the location of stimulating sites on the figures is based on coordinates taken during the experiment from surface landmarks (midline, surface, dorsal root entry zone) and coordinates from the manipulandum. All cats were killed by an overdose of Sodium Pentobarbital i.v. and the spinal cord was then removed for histology. The spinal cord was first placed in a fixative of 4% paraformaldehyde in phosphate-buffered saline (PBS) 0.2 M for at least 24 hours. It was then transferred to a solution of 20% sucrose-10% paraformaldehyde in PBS, pH 7.3, at room temperature for cryoprotection. Segments of the spinal cord were then frozen individually in methylbutane cooled with liquid nitrogen. The spinal cord enlargements were cut into 20  $\mu$ m transverse sections, put onto Superfrost Plus slides (Fisher) and Nissl-stained to facilitate histological identification. Drawings of spinal cord sections were based on the histology of two spinal cats and made with a Camera Lucida. Photomicrographs were taken with a Nikon Coolpix 995 digital camera custom-fitted on a Nikon Optiphot-2 microscope.

## Results

### *Responses evoked by the stimulation*

Before any drug injection, no spontaneous locomotor activity of the hindlimbs was observed in the 18 cats tested, including the trained spinal cats, even a few hours after decerebration. The necessary extensive laminectomy as well as the sturdy fixation of the vertebral column by vertebral pins might be responsible for the absence of locomotion. Nonetheless, spinal reflexes were always present (e.g. withdrawal reflex in the ipsilateral hindlimb following a pinch of the paw), and most often perineal stimulation could elicit bilateral tonic flexion of the hindlimbs or tonic discharge in some muscles but no rhythmic activity. All such testing occurred while the treadmill was moving.

Typically, when stimulation was applied as the electrode was descended through the cord, different types of responses were evoked successively, and each different type of response could be evoked over a 1-2 mm distance. The responses varied depending on the laterality and the segment stimulated. An example of the type of responses induced along a stimulation track in an untrained spinal cat post- clonidine is shown in Fig 2 where the stick figures illustrate the movements recorded from video clips. ISMS at rostral L3, 1mm left of the midline evoked flexion of the ipsilateral hindlimb in the first mm below the surface. At 1 mm, ipsilateral flexion was accompanied by locomotion of the contralateral hindlimb. The contralateral locomotion ceased at 2.7 mm below the dorsal surface and the amplitude of ipsilateral flexion diminished to the point of being barely noticeable at around 3 mm. At 3.7 mm, ipsilateral flexion became vigorous again and was accompanied by a contralateral extension. This response was observed until the ventral most area tested in this track. At each point assessed along the tracks, responses evoked were very stable and the same response could be evoked with each train of stimulation. However, the amplitude of the responses often decreased after several trains. When the electrode was raised back up towards the dorsal surface, the inverted sequence of response was observed. This also confirms the stability of the responses.

Since a variety of responses were evoked at distinct sites in the spinal cord, they were grouped based on the involvement of one or both hindlimbs, and the presence or

absence of locomotor rhythms. These generic responses were similar enough between cats to allow their inclusions into groups. These groups were then mapped for L3 to L7 segments, at various lateralities and depths for all cats. The first group includes non-locomotor responses that were evoked only in the hindlimb ipsilateral to the stimulation (flexion or extension responses). The second group includes non-locomotor flexion/extension responses, involving both hindlimbs simultaneously. The third group consists of locomotor responses. The kinematics and electromyographic description of those responses as well as their distribution in the spinal cord are presented in the following sections.

### **Non-locomotor ipsilateral responses**

#### **Description of the responses**

Ipsilateral flexion responses represent about 40% of all responses obtained across preparations (c.f. table 2). Flexion movement usually occurs at all joints, but in some cases overall flexion of the limb is composed of an important flexion at one joint with no movement or with a small extension movement at other joints. Although different patterns of flexion can be observed, only movements in which the limb was brought up and/or forward were included in this category. Fig. 3A illustrates the movement of the ipsilateral hindlimb which is directed forward and upward and the joint angular excursion shows that flexion occurred at the hip and ankle joints, with a slight extension at the knee and MTP. EMG averaging of 8 consecutive responses shows bursts of activity in all ipsilateral muscles when the stimulation was first applied, with a preponderant activation of flexor muscles TA and Srt. Another pattern of flexion is shown in Fig. 3B. The kinematics and joint angle pattern resembles the swing phase of the locomotor cycle: flexion occurs mainly at the hip, extension occurs at the knee and a small flexion followed by extension at the ankle and MTP joints. However, no active extensor activity was observed in muscles following that flexion and the limb was passively extended by the treadmill after the flexion response.



ISMS could also evoke ipsilateral extension of the hindlimb (a mean of 7% of all responses across preparations; c.f. table 2). Two distinct profiles of extensions were mostly observed. In the first one, the amplitude of extension at the joints is quite small and there is co-contraction of both flexor and extensor muscles. The ankle extends and the proximal part of the leg stiffens (not illustrated). The second type of extension involved a backward limb extension. In Fig. 3C, the stick figure shows an important extension at the hip, ankle and MTP and a smaller extension at the knee. The average angle excursion confirms that extension occurs at all joints and EMG averaging shows synchronous burst of activity in all ipsilateral muscles (including flexor muscles), with GL being more prominent. The third ipsilateral response observed was a flexion followed by extension (2 % of all responses across preparations). In the stick figure and angle averaging of Fig 3D, a clear flexion can be observed at all joints during the stimulation and an active extension can be observed after the stimulation has stopped. This bout of alternating flexion/extension activity is reflected in the EMG averaging where TA of the ipsilateral hindlimb is mainly active throughout the stimulation. When the stimulation stops, a burst in GL and VL is triggered. Both flexion and extension movements were brisk and the hindlimb did not touch the treadmill at any point during those movements. Hence, we did not consider this response to be locomotor though it may be a prelude to rhythmicity. Indeed, there was one more alternation between LSt (knee flexor) and LVL (knee extensor) following that response. Note that small bursts of activity follow the main response illustrated in Fig. 3A, B and C. These after-bursts were observed in the untrained post-clonidine condition and in both trained conditions, but they were absent from the untrained pre-clonidine preparation.

Other ipsilateral responses were triggered such as abduction, adduction or external rotation, but they were not observed systematically. However when they accompanied flexion or extension responses, they were classified in the flexion or extension group. Abdominal contractions were also observed. Those responses are included in table 2 under 'other responses'. Furthermore, a zone of hypoexcitability was observed, where ipsilateral responses were barely noticeable or absent during stimulation. This zone occurred at depths varying from 2 to 4 mm below the dorsal surface, but only covered about 0.5 to 1 mm. They correspond to about 14 % of the responses across preparation and

are included in table 2 under 'small/no response'. Finally, responses of extension followed by small flexion were rarely observed and were not classified in this study.

### **Untrained spinal cats**

#### *1- pre- clonidine*

Figure 4A shows the distribution of ipsilateral flexion (black), ipsilateral extension (gray) and ipsilateral flexion followed by ipsilateral extension (white) responses by segment (upper graph), laterality (middle graph) and depth (lower graph). The value of each bar represents the percentage of each response out of all the other responses obtained by stimulating at that segment, laterality or depth respectively. The total number of stimulation is indicated below each bar groups.

Ipsilateral flexion (Figure 4-column A) was evoked in 57% of the sites from all segments of the spinal cord (see Table 2). It was also triggered at all lateralities, namely medially (midline to 1 mm on each side), in the dorsal root entry zone (DREZ, from 1mm to 2 mm on either side of the midline) and laterally (more than 2 mm on either side of the midline), with a somewhat higher prevalence more laterally. Flexion was mainly induced dorsally (dorsal surface to 2 mm below), and to a lesser extent in the intermediate area (2 to 4 mm) and ventrally (deeper than 4 mm). Ipsilateral extension was mainly triggered in caudal segments L6-L7, in the DREZ and lateral zones and from intermediate and ventral areas. Few responses of flexion followed by extension could be evoked in caudal segments, around the medial and dorsal root entry zone and dorsally.

#### *2- post- clonidine*

After clonidine (Fig. 4B), ipsilateral flexion was still the most frequent response but formed a smaller fraction of all responses obtained (30%; Table 2). It was evoked from all segments, with a higher prevalence rostrally, from all lateralities with a tendency towards the lateral zone and was mainly triggered dorsally. Ipsilateral extension was triggered in all segments but mainly caudally, and was mostly evoked from lateral and ventral areas. A few responses of flexion followed by extension could be evoked in this preparation from rostral and caudal segments, at all lateralities and in the dorsal area. Thus, the distribution of ipsilateral responses was very similar before and after clonidine in the

untrained spinal cat with a greater proportion of ipsilateral extension response after clonidine.

## **Trained spinal cats**

### *1-pre-clonidine*

All responses described for untrained spinal cats were also observed in this preparation. Before clonidine injection, ipsilateral flexion is evoked with a lower proportion (39%) than in the untrained spinal cat pre-drug. The distribution follows that of the untrained spinal cat, and is triggered in all segments, from all lateralities and from dorsal and intermediate sites mainly (Fig. 4C). Ipsilateral extension is evoked in more rostral segments than in the untrained cat, and is mostly triggered from the medial and dorsal root entry zone and at all depths. Ipsilateral flexion followed by extension occurred more frequently in the trained spinal cat and was evoked from rostral and caudal segments, in medial and dorsal root entry zones and at all depths.

### *2- post- clonidine*

After clonidine i.v., ipsilateral flexion was still evoked in all segments (higher proportion in L3 to L5), mainly laterally and dorsally (Fig. 4D). Ipsilateral extension was triggered from rostral and caudal segments, mainly laterally and from all depths. Flexion followed by extension response was evoked in rostral segments, and as in the other preparations, was mainly elicited from medial and dorsal root entry zones and dorsal areas.

Thus, the distribution of effective sites for the three types of ipsilateral responses was generally the same as in other conditions. However, in the trained condition, the distribution of ipsilateral extension was more spread out. While the percentage of ipsilateral extension and ipsilateral flexion followed by extension did not vary greatly across the preparations, the percentage of ipsilateral flexion alone decreased largely post-clonidine and with training.

Although the general distribution patterns are described by segments, laterality and depth in Fig. 4, actual loci where these 3 ipsilateral responses were triggered are plotted

by segments in the four conditions tested in Fig 5. Each dot represents a type of response (ipsilateral flexion in blue, ipsilateral extension in red and ipsilateral flexion followed by extension in yellow), and the size of the dot reflects the number of times (n) that particular response was triggered from a particular locus. In the untrained spinal cat pre-clonidine, ipsilateral flexion was triggered in all segments but formed a higher proportion of the responses in the rostral segments, being the only ipsilateral response triggered in L4 and L5. Ipsilateral extension occurred in those segments only after clonidine. In caudal segments, extension occurred more frequently and was triggered from more ventral areas than flexion. In the trained spinal cat, ipsilateral extension responses are less restricted to the ventral area and were triggered from rostral segments even prior to clonidine.

To determine if the difference in the distribution of ipsilateral responses were significant we applied a Student' t test between localization of sites that induce ipsilateral flexion and ipsilateral extension. The test was performed only in the untrained post-clonidine preparations which were mainly investigated. We compared the segmental, laterality and depth distribution of both responses. On average, ipsilateral flexion was induced in all segments, at  $1,1 \pm 0,7$  mm from the midline (laterality) and  $1,4 \pm 1,3$  mm below the dorsal surface (depth). Ipsilateral extension was mainly evoked from caudal segments (see Fig. 4B top graph and Fig. 5 second column), from more lateral sites ( $1,5 \pm 0,9$ ;  $p < 0,05$ ) than ipsilateral flexion as well as more ventral sites ( $2,1 \pm 1,8$ ;  $p < 0,05$ ).

### *Non-locomotor bilateral responses*

This category includes responses evoked by ISMS in both legs simultaneously. Ipsilateral flexion accompanied by contralateral extension represents 11 % of all responses across preparations (see Table 2). In Fig. 6A, the EMG averages show that muscles of both limbs are activated, but mainly the VL and GL of the contralateral hindlimb (right) and the TA and Srt of the ipsilateral limb (left).

The second response of this group (9% of all responses across preparations) is bilateral flexion and consists of simultaneous flexion in both limbs As seen in Fig. 6B, in which St and TA discharge in the ipsilateral hindlimb while St, VL and mainly TA discharge on the contralateral side.

Bilateral extension was the third response triggered in that group (3% of all responses) and translated either as stiffening of both limbs, as the later half of a gallop or as a combination of stiffening in one leg and backward extension in the other leg. In Fig. 6C, stimulation mainly activated the GL of both limbs.

A few rare responses consisted in extension of the contralateral hindlimb only without ipsilateral flexion. Another response was ipsilateral extension with contralateral flexion which corresponded to 1 % of all responses. Both those responses are included in table 2 under 'other responses'.

### ***Untrained spinal cats***

#### *1-pre-clonidine*

Ipsilateral flexion with contralateral extension was mainly evoked by the stimulation of rostral segments (Fig. 7A), medially and ventrally. Bilateral flexion was triggered from all segments (but mainly rostrally), medially and dorsally. Bilateral extension was rarely observed in the pre-clonidine condition. It was triggered from the L6 segment, medially and at intermediate depths.

#### *2- post- clonidine*

After clonidine, ipsilateral flexion with contralateral extension is evoked from all segments more or less equally, mainly medially, and from intermediate and ventral depths (Fig. 7B). Bilateral flexion and bilateral extension were triggered from all segments, mostly medially, and bilateral flexion was evoked from more dorsal locations ( $1.6 \pm 1.4$ ) compared to bilateral extension which was evoked from more ventrally ( $3.31 \pm 1.9$ ;  $p < 0.05$ ). This distribution is reflected in Fig 8 (second column) where bilateral extension (red dots) is mainly evoked in the intermediate zone and ventrally.

### **Trained spinal cats**

#### *1-pre- clonidine*

Ipsilateral flexion with contralateral extension was triggered in both rostral and caudal segments (but surprisingly not in L5 in the 3 cats tested as seen in Fig. 7C), from all

lateralities, and from intermediate and ventral depths. Distribution of bilateral flexion was also similar as the untrained pre-clonidine, being mostly evoked in rostral segments, medially and dorsally. Bilateral extension was triggered from rostral segments, contrary to the untrained spinal cat, from the DREZ and more ventrally than bilateral flexion.

### *2-post- clonidine*

In the post clonidine state (Fig. 7D), distribution of ipsilateral flexion with contralateral extension and bilateral flexion were similar than prior to clonidine while bilateral extension was triggered from all segments, all lateralities and from intermediate and ventral areas, resembling more the untrained post-clonidine distribution than the trained pre-clonidine distribution.

Figure 8 shows the distribution of the loci where bilateral responses were evoked per segment in the four conditions tested. The main feature of these spinal cord drawings is that bilateral responses are mainly evoked medially, compared to ipsilateral responses. This is especially true for bilateral flexion and bilateral extension. A comparison between the sites where those responses were triggered and the sites where ipsilateral flexion and extension were triggered shows a significant difference: bilateral responses are induced at  $0.7 \pm 0.7$  laterality which is significantly more medial than ipsilateral responses ( $1.2 \pm 0.7$ ;  $p < 0.05$ ). Another feature is that bilateral flexion is triggered in relatively more dorsal sites than bilateral extension, mimicking the distribution of ipsilateral flexion and ipsilateral extension respectively (see especially Fig. 8, untrained post, segments L4 to L7). Ipsilateral flexion with contralateral extension was induced from all segments and mainly in the intermediate and ventral depths. Sites evoking ipsilateral flexion with contralateral extension ( $2.5 \pm 1.7$ ) are also located significantly more ventrally than sites evoking bilateral flexion ( $1.6 \pm 1.4$ ;  $p < 0.05$ )

Overall, the spinal distribution of bilateral responses did not vary greatly in the different preparations. However, while the percentage of bilateral extension remained relatively similar, the proportion of ipsilateral flexion with contralateral extension and of bilateral flexion increased post-clonidine and training.

### **Locomotor responses**

Three types of locomotor responses were induced. The first one was locomotion of the ipsilateral hindlimb only and was the rarest form of locomotion occurring in one limb only (about 1% of all responses). It consists of an upward and forward movement (flexion) of the ipsilateral leg during swing followed by an active extension. Thus there was a clear alternation between flexor and extensor muscles in the ipsilateral hindlimb only and no locomotion in the contralateral hindlimb. The verification of the EMG activity was crucial for this response, as certain patterns of ipsilateral flexion could resemble the swing phase of the locomotor cycle, but were not locomotor (see Fig. 3B). EMG activity during a bout of ipsilateral locomotion is depicted in Figure 9A, where the stimulation applied on the right side of the cord could elicit alternate activity between flexor (RSt, RSrt, RTA) and extensor (RVL, RGL) muscles of the ipsilateral hindlimb (right). EMG bursts were triggered in the contralateral St (left) evoking a flexion response at almost each stimulation, which alternated with the swing phase of the ipsilateral hindlimb (see RSt vs LSt). No active extension was observed in the contralateral left hindlimb.

The second and most prevalent type of unilateral locomotion was contralateral hindlimb locomotion (about 14% of all responses in the trained and post-clonidine conditions). This response consists of an alternation between flexor and extensor muscles and a forward and upward movement of the contralateral hindlimb during swing. Contralateral locomotion could be expressed with no response in the ipsilateral hindlimb (less frequent) or could be accompanied by one of the three ipsilateral responses described earlier namely ipsilateral flexion, which was the most prominent, ipsilateral extension and ipsilateral flexion followed by extension. An example of contralateral locomotion with ipsilateral flexion is shown in Fig. 9B. EMG trace shows rhythmic and alternating activity between the flexor (LSt) and extensor (LVL) muscles of the contralateral hindlimb (left), while rhythmic synchronous EMG discharge are observed in the muscles of the ipsilateral limb (RSt, RVL, RSrt).

The third type of locomotor response is bilateral hindlimb locomotion which is defined as an alternation between flexor and extensor muscles in each hindlimb, a forward and upward movement of the hindlimb during the swing phase of the cycle and an out-of-phase alternation between both hindlimbs (represents 11% of responses in trained and post-

clonidine conditions). As can be seen in Fig 9C, locomotion was induced with trains of stimulation at L3 in a trained spinal cat post-clonidine. The analysis of the stick figures illustrates the amplitude at the joints during swing. EMG bursts are well defined and organized. Hence, the alternation between flexor and extensor muscles on the left and right side is clear. There is also a well defined reciprocal activity between flexor and extensor muscles of the left and right hindlimb of the animal. The electrolytic lesion in Figure 9D displays an effective site (2 mm below the dorsal surface) evoking locomotion at the L4 segment.

### Untrained spinal cats

#### *1-post- clonidine*

Since only a single locomotor response could be elicited in the 6 untrained cats that were tested pre-clonidine, only the results obtained post-clonidine will be presented. Figure 10A shows that the very few ipsilateral locomotion responses that were obtained (squared pattern) are scattered in all segments, lateralities and depths more or less equally.

On the other hand, contralateral locomotion (solid bar) is evoked in all segments, mainly at L6, in medial and dorsal root entry zones and is triggered dorsally and ventrally, with a decrease in the intermediate zone (Figure 10A, bottom graph). To determine if the localization of effective sites for contralateral locomotion depended on the accompanying ipsilateral response, further analysis for this response was done and plotted in the histograms of the contralateral locomotion. The bar representing contralateral locomotion in the histogram was subdivided in three, whether contralateral locomotion was expressed with ipsilateral flexion (black), ipsilateral extension (gray) or ipsilateral flexion followed by extension (white). Contralateral locomotion expressed with ipsilateral flexion was evoked mainly in L3 and L6 and in dorsal areas, similarly to what the distribution of effective sites were for simple ipsilateral flexion. Contralateral locomotion with ipsilateral extension was mainly elicited in caudal segments and in ventral areas, in parallel to the distribution of ipsilateral extension. Contralateral locomotion expressed with ipsilateral flexion followed by extension is evoked in rostral and caudal segments, dorsal root entry zones and lateral zones and is more prominent dorsally. Dorsal localizations were also the most efficient to trigger ipsilateral flexion followed by extension alone. Similarly to bilateral non-locomotor



response, contralateral locomotion is triggered from more medial sites ( $0.8 \pm 0.5$ ) than the corresponding ipsilateral response alone ( $1.2 \pm 0.8$ ;  $p < 0.05$ ).

Bilateral locomotion (Fig. 10A; striped pattern) is triggered in all segments with a higher prevalence towards the caudal segments, medially ( $0.88 \pm 0.68$ ) compared to ipsilateral responses ( $1.2 \pm 0.8$ ;  $p < 0.05$ ) and is almost exclusively evoked from dorsal localizations (mean depth:  $0.5 \pm 0.8$  below the dorsal surface). The depth histogram illustrates that the vast majority of bilateral locomotion sequences were evoked between the dorsal surface and 3 mm deep, the efficiency decreasing quickly as the electrode progressed more ventrally.

### **Trained spinal cats**

#### *1-pre- clonidine*

Ipsilateral locomotion was rarely triggered in this preparation. However, contralateral locomotion with ipsilateral flexion was triggered in a proportion of 17%, and effective stimulation sites were mainly localized caudally in L6 and L7, laterally and in dorsal and intermediate areas (Fig. 10B). Compared to the untrained spinal cat post-clonidine, caudal segments, lateral zones and intermediate depths are more efficient in this preparation to induce contralateral locomotion.

#### *2-post- clonidine*

Few bouts of ipsilateral locomotion were evoked in the dorsal part of L3 segment. Contralateral rhythms are still triggered with a higher prevalence in caudal segments (Fig. 10C). It is mainly evoked medially and dorsally, with a peak in the ventral area ([4-5]). Bilateral locomotion was mainly evoked in segments L3, L6 and L7, in the dorsal root entry zone and in dorsal areas. Those distribution patterns are similar to those observed in untrained spinal cat post-clonidine.

Figure 11 shows the distribution of effective sites for unilateral locomotion responses (ipsilateral and contralateral) per segment. In the post-clonidine conditions, unilateral locomotion was mainly induced medially and dorsally, but was not triggered laterally. However, ventromedial areas were also efficient in L6 and L7 segments of the untrained-post condition. In the trained pre-clonidine, unilateral locomotion was mainly

evoked in L6 and also in L7. Contralateral locomotion was triggered from more lateral sites in the pre-clonidine ( $1.2 \pm 0.5$ ) than in the post-clonidine condition ( $0.7 \pm 0.3$ ;  $p < 0.05$ ).

Figure 12 shows the distribution of effective sites for bilateral locomotor responses per segment. The main observation is that the vast majority of sites that induce bilateral locomotion are located in the dorsal funiculi and the distribution of those sites is similar in all segments.

#### Effect of clonidine and training/chronicity

Electrical stimulation evoked predominantly flexor responses in all preparations tested, but the proportion of responses that consisted in ipsilateral flexion diminished in post-clonidine or trained condition due to the emergence of other more complex responses. Table 2 shows that in the untrained spinal cat pre-clonidine, 58 % of all responses evoked were ipsilateral flexion compared to 30 % post-clonidine and 39% in trained spinal cats pre-clonidine. Alternatively, apart for one bout of ipsilateral locomotion induced, no locomotor responses could be evoked in untrained spinal cat pre clonidine compared to 29 % after clonidine, 18 % in the trained spinal cat pre-clonidine and 36 % in the trained spinal cat post clonidine. It thus seems that some sites that elicited ipsilateral flexion could induce locomotor responses later on post-clonidine or training.

In Fig. 13, a stimulating track made in an untrained spinal cat pre and post-clonidine is shown on the left side of this figure. In the pre-clonidine condition, ISMS first elicited an ipsilateral flexion when the electrode tip touched the dorsal surface at L6. The electrode was descended ventrally and at 3 mm below the dorsal surface, a decrease in the amplitude of flexion was observed to the point of being abolished. At 4 mm, ipsilateral extension with contralateral flexion was triggered and at 5 mm, ipsilateral flexion was evoked again. Post-clonidine, ipsilateral flexion was elicited in the first 2 mm. From 2 mm to 4 mm below the dorsal surface, a zone of hypoexcitability was encountered where ipsilateral flexion became very faint. At 4 mm, ipsilateral extension with contralateral flexion was triggered followed at 5 mm deep by bilateral extension interrupted by sequences of ipsilateral extension with contralateral locomotion. Therefore, ipsilateral flexion induced ventrally pre-clonidine was no longer evoked post-clonidine. A locomotor response was evoked at that site instead

In the trained spinal cat, ISMS is applied at L4. Pre-clonidine, ipsilateral flexion is induced in the first two mms. As the electrode was descended, bilateral flexion was induced from 2 to 3mm below the dorsal surface. At 3 mm, ipsilateral flexion was triggered again and at 4.5 mm, ipsilateral flexion is accompanied by contralateral extension. Post-clonidine, ipsilateral flexion with contralateral locomotion was induced from the dorsal surface to 1.8 mm. Bilateral locomotion was then observed until 2.8 mm, where the response in the contralateral hindlimb disappeared and very faint ipsilateral flexion occurred, but was quickly no longer noticeable as the electrode is descended. At 4.4 mm ipsilateral flexion with contralateral extension was triggered. In this cat, sites that induced ipsilateral flexion dorsally before clonidine, evoked locomotor responses after clonidine. Thus, after injection of clonidine, there is a relation between the decrease of simple ipsilateral flexion and the more frequent occurrence of bilateral or locomotor responses.

## Discussion

Intraspinal microstimulation (ISMS) applied with one electrode at different lateralities and depths in segments L3 to L7 in chronic spinal cats, pre and post-clonidine, triggered three main types of hindlimb responses: non-locomotor ipsilateral responses, non-locomotor bilateral responses and locomotor responses. The distribution of sites where each response was preferentially evoked generally followed gradients in the rostrocaudal, mediolateral and dorsoventral axis. These gradients remained more or less stable in the pre and post-clonidine conditions in untrained spinal cats spinalized 5-7 days earlier, but were more varied in the trained spinal cats spinalized 3-5 weeks earlier. The prevalence of certain responses varied greatly across the four conditions (trained, untrained, pre- or post-clonidine). Indeed with clonidine and/or training, the percentage of simple ipsilateral flexion decreased and was paralleled by a higher occurrence of more complex locomotor responses.

### Methodological considerations

In these experiments, it was very difficult to trigger locomotion with the usual stimuli (treadmill movement, perineal stimulation) without adding a pharmacological stimulation, even in trained spinal cats who had recovered locomotion on the treadmill. Since the cats were spinalized at least 1 week prior to the acute experiment, a spinal shock cannot explain this difficulty in triggering locomotion. Rather, it might be explained by the spinal fixation used to immobilize the cat. Such sturdy fixation was required to rigidly suspend the animal and diminish movements of the spinal cord secondary to respiration or limb movements, an essential condition to insure repeated and accurate stimulation of the same spinal loci with a rigid electrode. The fixation undoubtedly provided noxious stimulation that may have contributed to a change in the excitability making the expression of locomotion more difficult or often incomplete.

In these experiments, ventralmost and lateralmost regions were somewhat less studied than dorsal and medial regions (see Fig. 1). For ventralmost regions, since the risk of damaging the electrode and the cord was high, they were not assessed as frequently as

other regions. Furthermore, each track could take up to 10-15 minutes and, to insure stability when comparing sites of stimulation, we had to limit the number of tracks in any given experiments.

Gradient of distribution were consistent in every cat and differences between localization of different types of responses were found to be significant in the untrained spinal cat post-clonidine. However, in each condition, the variability of responses observed between cats was important. Hence, the mapping of localizations is not identical for all cats, but the distribution gradients are the same for all cats. Furthermore, each response was determined by observation of videos and corresponding EMG. It is possible that with this method of analysis, we might have missed some responses. Obviously, our EMGs sample is limited to a few muscles and the movements are analyzed in only the sagittal plane. The responses were also grouped in large categories (flexion, extension, locomotion) involving the ipsilateral and/or the contralateral sides. This might have ignored more subtle patterns but surely has captured the main categories of responses. Since the aim of the present research was to find sites of predilection to induce locomotion, an emphasis was put on these sites whose location is described here. A more detailed account of the various characteristics of locomotion evoked from different sites is the subject of a forthcoming paper.

In the present study, trains of stimulation were used to induce the responses and allow the hindlimb to return to its initial position. When locomotion was induced, trains were used with the aim of controlling the locomotor frequency. However we have also used tonic stimulation to induce locomotion and preliminary data were presented previously (Barthélemy et al., 2002).

### **Elements activated by the stimulation**

Using a single electrode and relatively low intensities of electrical stimulation (20-90  $\mu\text{A}$ ), it is estimated that the stimuli used (below 100  $\mu\text{A}$ ) would not spread further than a diameter of 1 mm (Gustafsson and Jankowska, 1976; Porter, 1963; Lemay and Grill, 2004; Jankowska and Roberts, 1972; Bagshaw and Evans, 1976; Yeomans et al., 1986; Tai et al., 2003). Thus, most responses might be explained by elements that are in the vicinity of the electrode tip, such as dendrites, cellular bodies and fibers (ascending and

descending). Another evidence of the short range of the direct stimulation is the occurrence of sites where the response was faint or absent. In those loci, mainly prominent at intermediate depths, the amplitude of the response diminished significantly and was often completely abolished at the same intensity of stimulation that induced frank responses at sites located just above or below.

ISMS is a non physiological means of activating groups of neurons, and it is difficult to determine with certainty which element the stimulation is activating. It will activate neurons directly or synaptically, through afferents from the periphery, axons from other interneurons or descending pathways. Nonetheless, the reproducibility and characteristics of certain major responses is consistent with the localization of interneurons and motoneurons involved in certain reflex pathways.

### **Non-locomotor ipsilateral responses**

#### Ipsilateral flexion and ipsilateral extension

Some of the responses described in this paper correspond to classic reflexes first described by Sherrington, like the classic flexion reflex. Different flexion patterns as mentioned in this study were also observed by Sherrington and depended on which nerve was stimulated. He referred to them as 'local sign' (Sherrington, 1910a). This is undoubtedly the basis for the numerous functional withdrawal responses also described in the rat (Schouenborg, 2002). Other reflexes included the 'direct extension' and the 'extensor thrust', which are likely to correspond to the two patterns of extension discussed here. These responses might correspond to the activation of 1a, 1b and group II afferents impinging on extensor motoneurons. While flexion was evoked in all segments, extension was evoked from more caudal segments. This parallels the location of the hip flexor and extensor motoneuronal pools. Also, the higher occurrence of flexion and extension responses laterally might be explained by the localization of motor nuclei innervating limb muscles that are localized laterally in the ventral horn compared to those innervating axial muscles (McHanwell and Biscoe, 1981; Nicolopoulos-Stournaras and Iles, 1983; Vanderhorst and Holstege, 1997).

The dorsoventral distribution of ipsilateral flexion and extension responses may reflect a topographical organization of descending pathways and the interneurons that

mediate their action. Indeed, vestibulo- and reticulospinal pathways which descend in ventral and ventrolateral quadrants mainly excite extensor muscles via interneurons located ventrally in the gray matter. (Armstrong and Edgley, 1984; Orlovsky and Pavlova, 1972b; Orlovsky, 1972b; Drew and Rossignol, 1984). Cortico and rubrospinal pathways, as well as some reticulospinal pathways, descend in the dorsolateral funiculi and activate mainly flexor muscles via interneurons located more dorsally in the spinal gray (Kuypers, 1982; Armstrong and Drew, 1984c; Armstrong and Drew, 1984a; Orlovsky, 1972a). We cannot disregard the possibility that descending axons from supralumbar levels, such as long propriospinal pathways from the brachial enlargement (English and Lennard, 1982; Jankowska et al., 1974), and supraspinal levels may be activated by ISMS, especially in animals lesioned only one week before.

Although some of the responses observed might indeed be due to the activation of these remaining descending pathways, it is however unlikely that neurotransmitters are still present in these pathways, based on work in noradrenergic pathways (Anden et al., 1972). Moreover, the distribution gradients were similar in untrained spinal cats spinalized 5-7 days prior to the experiments and in trained spinal cats, spinalized 21 to 35 days previously and in which descending axons have most likely degenerated. This suggests that descending pathways do not contribute in a preponderant manner in the response obtained here and implies that stimulation preferentially activates postsynaptic elements as suggested by Tresch and Bizzi (1999) and Lemay and Grill (2004), either directly or through intraspinal axons. This flexor/extensor polarity was also evidenced in the decerebrate cat (Tai et al., 2003; Lemay and Grill, 2004; Mushahwar et al., 2002).

Localization of flexor and extensor motoneuronal pools, suggesting that flexor motoneurons are located more dorsally in the ventral horn might contribute to the dorsoventral gradient of responses described here. However, in the cat, such distribution has been evidenced in the brachial enlargement but does not seem to be present in the lumbosacral enlargement (Sterling and Kuypers, 1967; Vanderhorst and Holstege, 1997).

#### Ipsilateral flexion followed by extension

Although in this pattern of response there was a clear alternation between flexor and extensor muscles, brisk ipsilateral flexion followed by a brisk extension was not

considered to be a locomotor response because the hindlimb did not touch the treadmill during extension and the movements were really very abrupt. Since there was no real swing or stance phase in these motions, it could not be interpreted as a step. This type of response was also described in the decerebrated and spinal animal (Sherrington, 1910a) and was called 'rebound extension following on reflex flexion'. It was suggested (Jankowska et al., 1967a) that there were mutual inhibitory connections between interneurons transmitting late excitation to flexor and extensor muscles in acute spinal cats injected with DOPA. Stimulating high threshold afferents (named flexor reflex afferents) produced a flexor discharge as well as inhibited interneurons to the extensor muscles ipsilaterally. At the end of the stimulation, a rebound effect might induce a discharge in the extensor of the ipsilateral hindlimb. The authors suggested that those alternating discharge may constitute evidence for a half-center organization of the network released after DOPA as a basis for locomotion. Interestingly in our experiments, ipsilateral flexion followed by extension was only elicited from dorsal sites as was bilateral locomotion.

Such pathways of interneurons might also account for the small bursts of flexor and extensor activity alternating after stimulation has stopped and which were more evident post-clonidine and training (see Fig. 3A,B). Thus, those responses might reflect an excitability level, concordant with a locomotor state of the spinal cord and represent the basis of a unilateral single step.

### **Non-locomotor bilateral responses**

Sites where bilateral responses were triggered were mainly observed medially. Though we can't rule out a spread of the current across the midline, stimulation of dorsal and ventral commissural pathways may explain that medial localization. Indeed, there are neurons in the lateral aspect of the dorsal horn, whose axons cross the midline within the posterior commissure and terminate in corresponding areas of the contralateral dorsal horn (Petko M. and Antal, 2000; Petko et al., 2004). Those neurons are integrated in spinal sensory circuits and may be activated by our stimulation to produce bilateral responses such as bilateral flexion. Ventrally, commissural interneurons located in the lamina VIII and neighboring lamina VII (Harrison et al., 1986) project contralaterally to other interneurons or to contralateral motor nuclei directly (Birinyi et al., 2003; Harrison



and Jankowska, 1985; Harrison et al., 1986; Edgley et al., 2003), and receive inputs from the group I afferents. Because of the input they receive and their projections, they are thought to be interposed in crossed reflex pathways (see Jankowska, 1992) and could mediate crossed reflex actions accompanying the flexion reflex from proprioceptors (Matsuyama et al., 2004). Stimulation might have activated these interneurons directly or indirectly, through other interneurons that make synapses on these commissural interneurons. One candidate would be dorsal horn interneurons that are thought to contribute to crossed reflexes from group II muscle afferents (Edgley et al., 2003). This ventromedial localization of elements that would induce contralateral responses was also observed in the spinal cord of other species, notably in the embryo of the mouse (Nissen et al., 2005) and in the neonatal rat (Kjaerulff and Kiehn, 1996; Kiehn and Kjaerulff, 1998).

Interneurons subserving flexion-extension reflexes, and activated by reflex afferent inputs, might also be involved in generation of the bilateral responses, because they are thought to activate contralateral extensor muscles as well as flexor muscles ipsilaterally (Lundberg, 1979). However, there are numerous crossed pathways that could give rise to a variety of crossed responses (Holmqvist, 1961). They could be involved in the generation of ipsilateral flexion with contralateral extension or the opposite response, ipsilateral extension with contralateral flexion. The latter response, rarely triggered in the present study, was only briefly mentioned in the literature (Sherrington, 1910a; Lemay and Grill, 2004).

## **Locomotor responses**

### Unilateral locomotion

Ipsilateral locomotion was the least frequent of the three locomotor responses evoked in this study and a clear gradient for it is difficult to establish. As mentioned before, a pattern of ipsilateral flexion followed by passive extension by the treadmill could resemble ipsilateral locomotion but there was no activity in extensor muscles and was thus not considered as locomotor.

Contralateral locomotion was the most prominent locomotor pattern evoked by ISMS. In the untrained spinal cat, ipsilateral flexion for each stimulation accompanied by a

continuous contralateral locomotion is evoked from both dorsal and ventral areas, but was preferentially evoked from the dorsomedial area. On the other hand, ipsilateral extension responses evoked by each train and contralateral locomotion was mainly evoked from the ventromedial area. This dorsoventral segregation is not as clear in the trained animals since contralateral locomotion with ipsilateral flexion or ipsilateral extension could similarly be evoked dorsally and ventrally. (Matsuyama et al., 2004) showed that most lamina VIII commissural interneurons discharge rhythmically during fictive locomotion. Similarly, Kiehn and coll. described a similar population of commissural interneurons that is involved in production of locomotion in the neonatal rat (Butt et al., 2002; Kiehn and Butt, 2003). Those interneurons are probably central in the pathways producing contralateral locomotion and that is activated by ISMS.

Ipsilateral flexion with contralateral locomotion was also observed by Sherrington. A noxious stimulus to a limb could induce a flexion reflex in the ipsilateral hindlimb accompanied by stepping of the three other limbs or, for spinal cats, of the contralateral hindlimb (Sherrington, 1910a). This response seen in the cat, dog and rabbit was interpreted to mean that the irritated foot was withdrawn from harm while the others ran away. Since there is a relative independence of central pattern generators for both limbs it is not surprising that ISMS can evoke locomotion on one side. Work in the chronic spinal kitten has clearly established that one hindlimb can walk while the other is prevented manually from walking (Grillner and Rossignol, 1978).

It is not surprising either that contralateral locomotion could be more easily evoked than ipsilateral locomotion. Often, the stimulation applied ipsilaterally perturbed the ipsilateral locomotor cycle while the contralateral cycle was only slightly perturbed. It is then possible that the ipsilateral stimuli imposed either a reset of the cycle or a sequence of excitation and inhibition that profoundly perturbed the ipsilateral cycle. The medial localization of sites inducing contralateral locomotion could suggest activation of various pathways through ipsilateral and commissural interneurons. It is of great interest to mention here the work of (Dai et al., 2005) who showed that *c-fos* labeled interneurons after a prolonged bout of locomotion were located medially in the cord. It could be that our stimulation could, in these cases, activate mainly such population of interneurons.

### Bilateral locomotion

Sites that would effectively induce a smooth and well coordinated bilateral locomotion were almost exclusively located dorsally, in dorsal and dorsolateral funiculi, as well as dorsal laminae. Thus stimulation of afferent pathways or of interneurons receiving those afferent inputs seems to evoke bilateral locomotion whereas stimulation deep in the intermediate gray did not evoke locomotion with our paradigm of electrical stimulation, using a single electrode. This dorsal localization is not surprising as numerous studies have demonstrated the efficiency of epidural and subdural stimulation in the decerebrate and spinal cat (Iwahara et al., 1991b; Gerasimenko et al., 2003), as well as dorsal funiculi (Grillner and Zangger, 1979). Stimulation of ventral parts of the spinal cord with a single electrode did not induce bilateral locomotion contrarily to other studies where stimulation through groups of electrodes localized in the motoneuronal pools of segments L5 to S1 induced locomotion (Saigal et al., 2004). The different technique used in that study might account for the difference.

Both contralateral locomotion and bilateral locomotion were evoked from all segments tested, but preferentially from caudal segments. This was especially clear for the contralateral locomotion in the trained spinal cat pre-clonidine. This finding relates to other studies showing that segments L5-L7 contain interneurons active during the production of locomotor pattern as revealed by localization of *c-fos* (Dai et al., 2005) or by evoked potential analysis (Noga et al., 1995).

Results concerning optimal rostrocaudal localization of electrodes to induce locomotion differ in the literature. Earlier reports by Iwahara et al. (1991b) showed that epidural and subdural stimulation of the pre-enlargement L1-L4 segments was as effective in inducing stepping as the L5-S1 segments in acute mid-thoracic spinal cats. Conversely, the border between L4 and L5 was found optimal to induce locomotion with epidural stimulation in chronic spinal cats (Gerasimenko and Lavrov, 2001; Gerasimenko et al., 2003). It was shown that stimulation through groups of electrodes were more efficient to induce locomotion in chronic spinal cats when applied to more caudal segments (Guevremont et al., 2003).

To induce bilateral or unilateral locomotion, the stimulation requires activation of propriospinal pathways, such as the commissural interneurons described earlier for

bilateral responses and that are located in the lamina VIII. Other propriospinal pathways include interneurons contacted by group II afferents (group II interneurons). They are located within L6-L7 segments, at the border of L4-L5 and of L3-L4 and some of them contact motoneurons in L4 to S1 directly via the ventrolateral funiculus (Edgley and Jankowska, 1987a; Edgley and Jankowska, 1987b; Lundberg et al., 1987b; Lundberg et al., 1987c; Lundberg et al., 1987a). Some of those interneurons in L4 were shown to be rhythmically active during locomotion (Shefchyk et al., 1990) and half of the interneurons located in L6-L7, project ipsilaterally within the lateral funiculus to the L4 segment (Riddell J.S and Hadian M, 2000). Previous experiments have shown that the L4 segment was essential for the induction of locomotion (Marcoux and Rossignol, 2000; Langlet et al., 2005) and preliminary evidence show that they would also be essential in the locomotion induced by ISMS applied in caudal segments (Barthélemy et al., 2002; Barthélemy et al., 2005b).

### **Effect of clonidine and training**

#### Rostral segments

The more frequent involvement of the contralateral hindlimb and the more complex responses triggered after injection of clonidine i.v. was especially true at segments L3, L4 and L5. For instance in untrained spinal cats pre-clonidine, ipsilateral extension and bilateral extension were mainly induced ventrally in caudal segments. Post-clonidine, those responses were evoked from rostral as well as caudal segments and at all depths of the spinal cord. In trained animals, contralateral locomotion was almost exclusively evoked from caudal segments, but post-clonidine, rostral segments as well as caudal segments were efficient to induce it. The fact that clonidine increases the locomotor responses mainly in rostral segments L3-L4 and L5 may suggest the preponderant activation of the subpopulation of commissural interneurons receiving input from group II afferents that are mainly located in midlumbar segments and that were shown to be modulated by monoamines (Bras et al., 1989b; Bras et al., 1990; Noga et al., 1992).

### State of excitability of the spinal cord

ISMS was applied in intact cats that were then decerebrated and spinalized (Mushahwar et al., 2004). They noted a change in the excitability of neuronal elements which made the flexor muscles more dominantly activated in acute spinal cat. This corresponded to 'flexion release' described by Sherrington where the flexion reflexes were increasingly present following acute spinalization. In the present study, the untrained pre-clonidine preparation exhibited an important proportion of flexion but in post-clonidine or training condition the proportion of flexion responses elicited decreased and allowed for a greater variety of responses. In fact, the changes brought about by clonidine were similar to that obtained with locomotor training and chronicity. Thus, clonidine may have activated pathways that become more excitable with chronicity and training.

### **Intraspinal electrical stimulation as a tool to restore locomotion**

It is thus possible to induce locomotion with ISMS delivered through a single electrode in combination post-clonidine. Locomotor responses could also be triggered in a spinal cat that recovered locomotor abilities. Compared to other intraspinal approaches, ISMS delivered through a single electrode has clear advantages. First, it means that stimulating several sites of the spinal cord in order to induce locomotion is not necessary, since one electrode is enough to evoke the complete bilateral pattern. It thus diminishes the number of electrode necessary to evoke locomotion. In the eventuality of chronic implants, the size of the implant could be minimal, causing minimal damage of the spinal cord. Bilateral locomotion was induced at low intensity which also suggests minimal negative effects. Furthermore, ISMS also has clear advantages over peripheral neuromuscular stimulation where multiple surface or indwelling electrodes have to be used to ensure proper activation of the different muscle groups in the proper sequence.

In conclusion, ISMS through a single electrode is thus efficient to evoke locomotion and constitutes a promising technique to restore locomotion after spinal cord injury. The spinal cord mapping of non-locomotor and locomotor responses evoked by ISMS as shown here should help focusing on important spinal sites and guide further chronic implants. The mechanisms by which locomotion may occur with ISMS are still

largely unknown but preliminary results indicate that the efficacy of ISMS relies on the integrity of the midlumbar segments (Barthélemy et al., 2005b).

## **Acknowledgements**

The authors wish to thank P. Drapeau for programming, C. Gagner for electronics, C. Gauthier for illustrations, F. Gauthier for help during surgery and J. Lavoie for histological assistance. This work was supported by an individual and a group grant from CIHR and also from a Tier 1 Canada Chair on spinal cord research to S.R (part support for H.L). D.B. received a studentship from FRSQ/FCAR Santé and the Groupe de recherche en sciences neurologiques. H.L. was also partly supported by a grant from the Quebec Mental Health and Neuroscience Network of the FRSQ.

## Bibliography

- Anden NE, Engel J and Rubenson A. Central decarboxylation and uptake of L-DOPA. *Arch Pharmacol* 273: 11-26, 1972.
- Armstrong DM and Drew T. Discharges of pyramidal tract and other motor cortical neurones during locomotion in the cat. *J Physiol* 346: 471-495, 1984a.
- Armstrong DM and Drew T. Topographical localization in the motor cortex of the cat for somatic afferent responses and evoked movements. *J Physiol* 350: 33-54, 1984b.
- Armstrong DM and Edgley S. Discharges of nucleus interpositus neurones during locomotion in the cat. *J Physiol* 351: 411-432, 1984.
- Bagshaw EV and Evans MH. Measurement of current spread from microelectrodes when stimulating within the nervous system. *Exp Brain Res* 25: 391-400, 1976.
- Barbeau H and Rossignol S. Recovery of locomotion after chronic spinalization in the adult cat. *Brain Res* 412: 84-95, 1987.
- Barbeau H and Rossignol S. Initiation and modulation of the locomotor pattern in the adult chronic spinal cat by noradrenergic, serotonergic and dopaminergic drugs. *Brain Res* 546: 250-260, 1991.
- Barthélemy D, Leblond H., Mushahwar V. and Rossignol S. Use of intraspinal electrical stimulation for inducing locomotion in spinal cats. *35th Congress of the International Union of Physiological Sciences (IUPS) San Diego, CA March 31 - April 5, 2005* 2005a.
- Barthélemy D, Leblond H., Provencher J and Rossignol S. Hindlimb motor patterns evoked by intraspinal or dorsal root stimulation at the same segment in spinal cats. *Soc Neurosci Abstr* 35: 2005b.
- Barthélemy D, Leblond H and Rossignol S. Electrical stimulation of the lumbar spinal cord and the importance of mid lumbar segments in eliciting spinal locomotion. *Soc Neurosci Abstr* 28: 2002.
- Birinyi A, Viskochy K, Weber I, Kiehn O and Antal M. Synaptic targets of commissural interneurons in the lumbar spinal cord of neonatal rats. *J Comp Neurol* 461: 429-440, 2003.
- Bras H, Cavallari P, Jankowska E and McCrea DA. Comparison of effects of monoamines on transmission in spinal pathways from group I and II muscle afferents in the cat. *Exp Brain Res* 76: 27-37, 1989.



- Bras H, Jankowska E, Noga B and Skoog B. Comparison of effects of various types of NA and 5-HT agonists on transmission from group II muscle afferents in the cat. *Eur J Neurosci* 211: 1029-1039, 1990.
- Budakova NN. Stepping movements evoked in a mesencephalic cat by a rhythmic stimulation of a dorsal root in mesencephalic cat. *Sechenov Physiol J of USSR* 57: 1632-1640, 1971.
- Butt SJ, Harris-Warrick RM and Kiehn O. Firing properties of identified interneuron populations in the mammalian hindlimb central pattern generator. *J Neurosci* 22: 9961-9971, 2002.
- Carhart MR, He J, Herman R, D'Luzansky S and Willis WT. Epidural spinal-cord stimulation facilitates recovery of functional walking following incomplete spinal-cord injury. *IEEE Trans Neural Syst Rehabil Eng* 12: 32-42, 2004.
- Chau C, Barbeau H and Rossignol S. Early locomotor training with clonidine in spinal cats. *J Neurophysiol* 79: 392-409, 1998.
- Dai X, Noga BR, Douglas JR and Jordan LM. Localization of spinal neurons activated during locomotion using the c-fos immunohistochemical method. *J Neurophysiol* 93: 3442-3452, 2005.
- de Leon RD, Hodgson JA, Roy RR and Edgerton VR. Locomotor capacity attributable to step training versus spontaneous recovery after spinalization in adult cats. *J Neurophysiol* 79: 1329-1340, 1998.
- Dimitrijevic MR, Gerasimenko Y and Pinter MM. Evidence for a spinal central pattern generator in humans. *Ann N Y Acad Sci* 860: 360-376, 1998.
- Drew T and Rossignol S. Phase-dependent responses evoked in limb muscles by stimulation of medullary reticular formation during locomotion in thalamic cats. *J Neurophysiol* 52: 653-675, 1984.
- Edgley SA and Jankowska E. An interneuronal relay for group I and II muscle afferents in the midlumbar segments of the cat spinal cord. *J Physiol* 389: 647-674, 1987a.
- Edgley SA and Jankowska E. Field potentials generated by group II muscle afferents in the middle lumbar segments of the cat spinal cord. *J Physiol* 385: 393-413, 1987b.

Edgley SA, Jankowska E, Krutki P and Hammar I. Both dorsal horn and lamina viii interneurons contribute to crossed reflexes from feline group ii muscle afferents. *J Physiol* 2003.

English AW and Lennard PR. Interlimb coordination during stepping in the cat: in-phase stepping and gait transitions. *Brain Res* 245: 353-364, 1982.

Forssberg H and Grillner S. The locomotion of the acute spinal cat injected with clonidine i.v. *Brain Res* 50: 184-186, 1973.

Gerasimenko Y and Lavrov I. Neurophysiology of mammalian spinal locomotion. *World Congress on Neuroinformatics Vienna 2001* 53, 2001.

Gerasimenko YP, Avelev VD, Nikitin OA and Lavrov IA. Initiation of locomotor activity in spinal cats by epidural stimulation of the spinal cord. *Neurosci Behav Physiol* 33: 247-254, 2003.

Gerasimenko YP, Lavrov IA, Bogacheva IN, Shcherbakova NA, Kucher VI and Musienko PE. Formation of locomotor patterns in decerebrate cats in conditions of epidural stimulation of the spinal cord. *Neurosci Behav Physiol* 35: 291-298, 2005.

Giszter SF, Mussa-Ivaldi FA and Bizzi E. Convergent force fields organized in the frog's spinal cord. *J Neurosci* 13: 467-491, 1993.

Grillner S and Rossignol S. On the initiation of the swing phase of locomotion in chronic spinal cats. *Brain Res* 146: 269-277, 1978.

Grillner S and Zangger P. On the central generation of locomotion in the low spinal cat. *Exp Brain Res* 34: 241-261, 1979.

Guevremont L, Renzi CG, Kowalczewski J, Saigal R and Mushahwar VK. Tonic intraspinal microstimulation of the lumbosacral cord generate rhythmic walking in spinal cats. *Soc Neurosci Abstr* 29: 276.5, 2003.

Gustafsson B and Jankowska E. Direct and indirect activation of nerve cells by electrical pulses applied extracellularly. *J Physiol* 258: 33-61, 1976.

Harrison PJ and Jankowska E. Electrophysiological evidence that interneurons located in laminae VIII of the spinal cord mediated crossed reflexes in the cat. *J Physiol* 358: 33P, 1985.

Harrison PJ, Jankowska E and Zytnicki D. Laminae VIII interneurons interposed in crossed reflex pathways in the cat. *J Physiol* 371: 147-166, 1986.

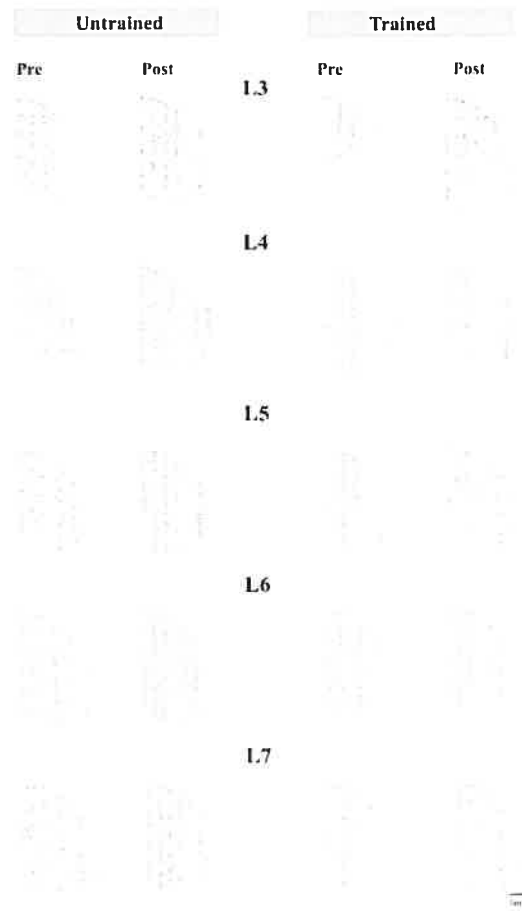
- Herman R, He J, D'Luzansky S, Willis W and Dilli S. Spinal cord stimulation facilitates functional walking in a chronic, incomplete spinal cord injured. *Spinal Cord* 40: 65-8, 2002.
- Holmqvist B. Crossed spinal reflex actions evoked by volleys in somatic afferents. *Acta Physiol Scand* 52: 1-66, 1961.
- Ichiyama RM, Gerasimenko YP, Zhong H, Roy RR and Edgerton VR. Hindlimb stepping movements in complete spinal rats induced by epidural spinal cord stimulation. *Neurosci Lett* 383: 339-344, 2005.
- Iwahara T, Atsuta Y, Garcia-Rill E and Skinner RD. Locomotion induced by spinal cord stimulation in the neonate rat In Vitro. *Somatosensor Motor Res* 8: 281-287, 1991a.
- Iwahara T, Atsuta Y, Garcia-Rill E and Skinner RD. Spinal cord stimulation-induced locomotion in the adult cat. *Brain Res Bull* 28: 99-105, 1991b.
- Jankowska E. Interneuronal relay in spinal pathways from proprioceptors. *Prog Neurobiol* 38: 335-378, 1992.
- Jankowska E, Jukes MGM, Lund S and Lundberg A. The effect of DOPA on the spinal cord. 5. Reciprocal organization of pathways transmitting excitatory action to alpha motoneurons of flexors and extensors. *Acta Physiol Scand* 70: 369-388, 1967.
- Jankowska E, Lundberg A, Roberts WJ and Stuart D. A long propriospinal system with direct effect on motoneurons and on interneurons in the cat lumbosacral cord. *Exp Brain Res* 21: 169-194, 1974.
- Jankowska E and Roberts WJ. An electrophysiological demonstration of the axonal projections of single spinal interneurons in the cat. *J Physiol* 222: 597-622, 1972.
- Kiehn O and Butt SJ. Physiological, anatomical and genetic identification of CPG neurons in the developing mammalian spinal cord. *Prog Neurobiol* 70: 347-361, 2003.
- Kiehn O and Kjaerulff O. Distribution of central pattern generators for rhythmic motor outputs in the spinal cord of limbed vertebrates. *Ann N Y Acad Sci* 860: 110-129, 1998.
- Kjaerulff O and Kiehn O. Distribution of networks generating and coordinating locomotor activity in the neonatal rat spinal cord *in vitro*: a lesion study. *J Neurosci* 16: 5777-5794, 1996.
- Kuypers HG. A new look at the organization of the motor system. *Prog Brain Res* 57: 381-403, 1982.

- Langlet C, Leblond H and Rossignol S. The mid-lumbar segments are needed for the expression of locomotion in chronic spinal cats. *J Neurophysiol* 93: 2474-2488, 2005.
- Lemay MA and Grill WM. Modularity of motor output evoked by intraspinal microstimulation in cats. *J Neurophysiol* 91: 502-514, 2004.
- Lundberg A. Multisensory control of spinal reflex pathways. *Prog Brain Res* 50: 11-28, 1979.
- Lundberg A, Malmgren K and Schomburg ED. Reflex pathways from group II muscle afferents 1. Distribution and linkage of reflex actions to  $\alpha$ -motoneurons. *Exp Brain Res* 65: 271-281, 1987a.
- Lundberg A, Malmgren K and Schomburg ED. Reflex pathways from group II muscle afferents. 2. Functional characteristics of reflex pathways to alpha- motoneurons. *Exp Brain Res* 65: 282-293, 1987b.
- Lundberg A, Malmgren K and Schomburg ED. Reflex pathways from group II muscle afferents. 3. Secondary spindle afferents and the FRA: a new hypothesis. *Exp Brain Res* 65: 294-306, 1987c.
- Marchetti C, Beato M and Nistri A. Alternating rhythmic activity induced by dorsal root stimulation in the neonatal rat spinal cord in vitro. *J Physiol* 530: 105-112, 2001.
- Marcoux J and Rossignol S. Initiating or blocking locomotion in spinal cats by applying noradrenergic drugs to restricted lumbar spinal segments. *J Neurosci* 20: 8577-8585, 2000.
- Matsuyama K, Nakajima K, Mori F, Aoki M and Mori S. Lumbar commissural interneurons with reticulospinal inputs in the cat: morphology and discharge patterns during fictive locomotion. *J Comp Neurol* 474: 546-561, 2004.
- McHanwell S and Biscoe TJ. The sizes of motoneurons supplying hindlimb muscles in the mouse. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 213: 201-216, 1981.
- Minassian K, Jilge B, Rattay F, Pinter MM, Binder H, Gerstenbrand F and Dimitrijevic MR. Stepping-like movements in humans with complete spinal cord injury induced by epidural stimulation of the lumbar cord: electromyographic study of compound muscle action potentials. *Spinal Cord* 42: 401-416, 2004.
- Mushahwar VK, Aoyagi Y, Stein RB and Prochazka A. Movements generated by intraspinal microstimulation in the intermediate gray matter of the anesthetized, decerebrate, and spinal cat. *Can J Physiol Pharmacol* 82: 702-714, 2004.

- Mushahwar VK, Gillard DM, Gauthier MJ and Prochazka A. Intraspinal micro stimulation generates locomotor-like and feedback-controlled movements. *IEEE Trans Neural Syst Rehabil Eng* 10: 68-81, 2002.
- Nicolopoulos-Stournaras S and Iles JF. Motor neuron columns in the lumbar spinal cord of the rat. *J Comp Neurol* 217: 75-85, 1983.
- Nissen UV, Mochida H and Glover JC. Development of projection-specific interneurons and projection neurons in the embryonic mouse and rat spinal cord. *J Comp Neurol* 483: 30-47, 2005.
- Noga BR, Bras H and Jankowska E. Transmission from group II muscle afferents is depressed by stimulation of locus coeruleus/subcoeruleus, Kolliker-Fuse and raphe nuclei in the cat. *Exp Brain Res* 88: 502-516, 1992.
- Noga BR, Fortier PA, Kriellaars DJ, Dai X, Detillieux GR and Jordan LM. Field potential mapping of neurons in the lumbar spinal cord activated following stimulation of the mesencephalic locomotor region. *J Neurosci* 15: 2203-2217, 1995.
- Orlovsky GN. Activity of rubrospinal neurons during locomotion. *Brain Res* 46: 99-112, 1972a.
- Orlovsky GN. Activity of vestibulospinal neurons during locomotion. *Brain Res* 46: 85-98, 1972b.
- Orlovsky GN and Pavlova GA. Vestibular responses of neurons of the descending tracts during locomotion. *Neurophysiology* 4: 241-245, 1972.
- Pearson KG, Jiang W and Ramirez JM. The use of naloxone to facilitate the generation of the locomotor rhythm in spinal cats. *J Neurosci Methods* 42: 75-81, 1992.
- Petko M. and Antal M. Propriospinal afferent and efferent connections of the lateral and medial areas of the dorsal horn (laminae I-IV) in the rat lumbar spinal cord. *J Comp Neurol* 422: 312-325, 2000.
- Petko M, Veress G, Vereb G, Storm-Mathisen J and Antal M. Commissural propriospinal connections between the lateral aspects of laminae III-IV in the lumbar spinal cord of rats. *J Comp Neurol* 480: 364-377, 2004.
- Porter R. Focal stimulation of hypoglossal neurones in the cat. *J Physiol* 169: 630-640, 1963.

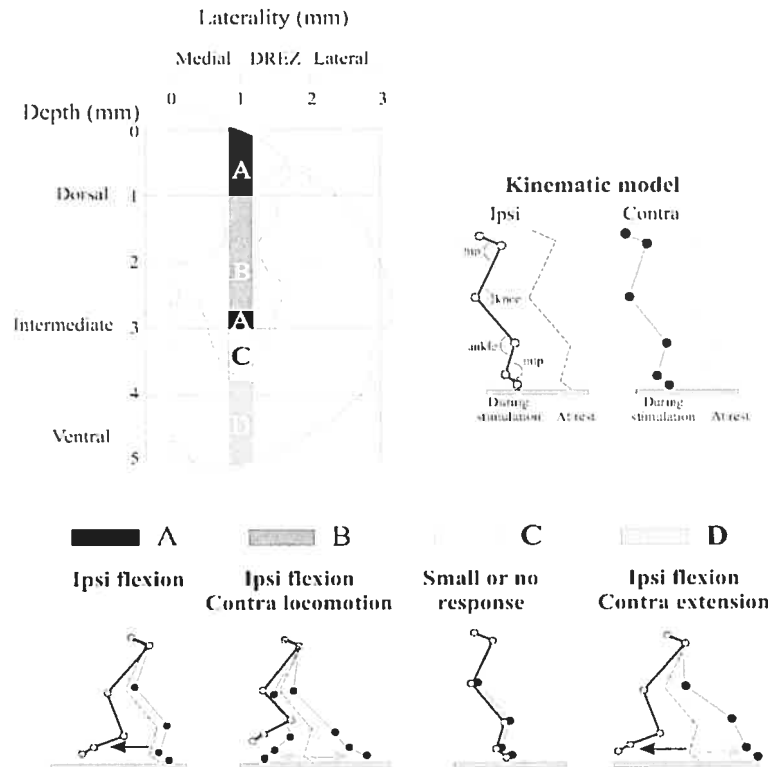
- Riddell J.S and Hadian M. Interneurones in pathways from group II muscle afferents in the lower-lumbar segments of the feline spinal cord. *J Physiol* 522.1: 109-123, 2000.
- Saigal R, Renzi C and Mushahwar VK. Intraspinal microstimulation generates functional movements after spinal-cord injury. *IEEE Trans Neural Syst Rehabil Eng* 12: 430-440, 2004.
- Schouenborg J. Modular organisation and spinal somatosensory imprinting. *Brain Res Brain Res Rev* 40: 80-91, 2002.
- Shapkova EY and Schomburg ED. Two types of motor modulation underlying human stepping evoked by spinal cord electrical stimulation (SCES). *Acta Physiol Pharmacol Bulg* 26: 155-157, 2001.
- Shefchyk S, McCrea DA, Kriellaars D, Fortier P and Jordan L. Activity of interneurons within the L4 spinal segment of the cat during brainstem-evoked fictive locomotion. *Exp Brain Res* 80: 290-295, 1990.
- Sherrington CS. Flexion-reflex of the limb, crossed extension-reflex, and reflex stepping and standing. *J Physiol* 40: 28-121, 1910.
- Stein RB, Aoyagi Y, Mushahwar VK and Prochazka A. Limb movements generated by stimulating muscle, nerve and spinal cord. *Arch Ital Biol* 140: 273-281, 2002.
- Sterling P and Kuypers HGJM. Anatomical organization of the brachial spinal cord of the cat. II. The motoneuron plexus. *Brain Res* 4: 16-32, 1967.
- Tai C, Booth AM, Robinson CJ, de Groat WC and Roppolo JR. Multi-joint movement of the cat hindlimb evoked by microstimulation of the lumbosacral spinal cord. *Exp Neurol* 183: 620-627, 2003.
- Tresch MC and Bizzi E. Responses to spinal microstimulation in the chronically spinalized rat and their relationship to spinal systems activated by low threshold cutaneous stimulation. *Exp Brain Res* 129: 401-416, 1999.
- Vanderhorst VGJM and Holstege G. Organization of lumbosacral motoneuronal cell groups innervating hindlimb, pelvic floor, and axial muscles in the cat. *J Comp Neurol* 382: 46-76, 1997.
- Yeomans J, Prior P and Bateman F. Current-distance relations of axons mediating circling elicited by midbrain stimulation. *Brain Res* 372: 95-106, 1986.

## Figures



### *Article1-Figure 1: Stimulated sites in segments L3 to L7*

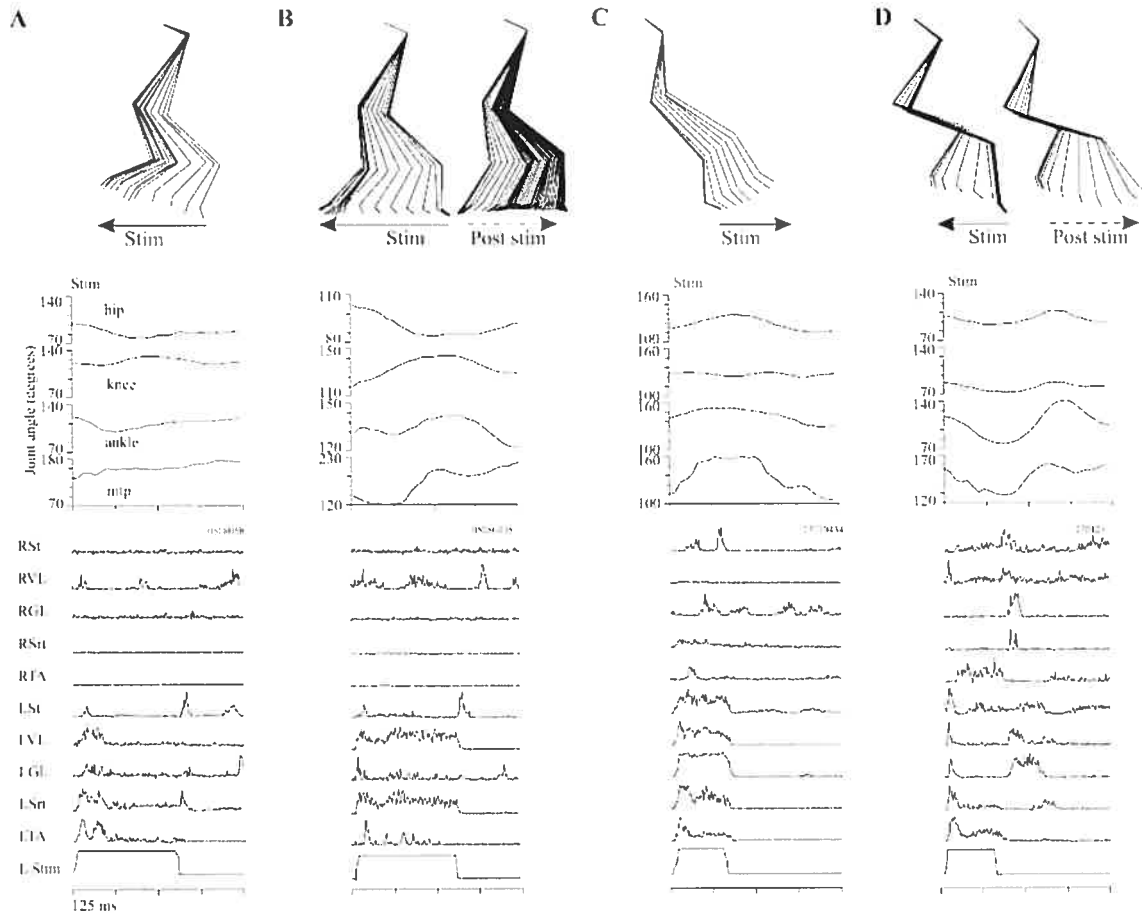
Sites that were stimulated in untrained spinal cat , as well as in trained spinal cats pre and post-clonidine are plotted on drawings of representative sections of spinal cords. Stimulation was applied on both sides of the cord, but since no difference was observed between sides, all stimulation sites are displayed on one half spinal cord. Spinal cord drawings were made with a Camera Lucida from histological material taken from 2 spinal cats. The 1 mm scale bar applies to all.



**Article1-Figure 2: Responses evoked along a typical stimulation track in a spinal cat**

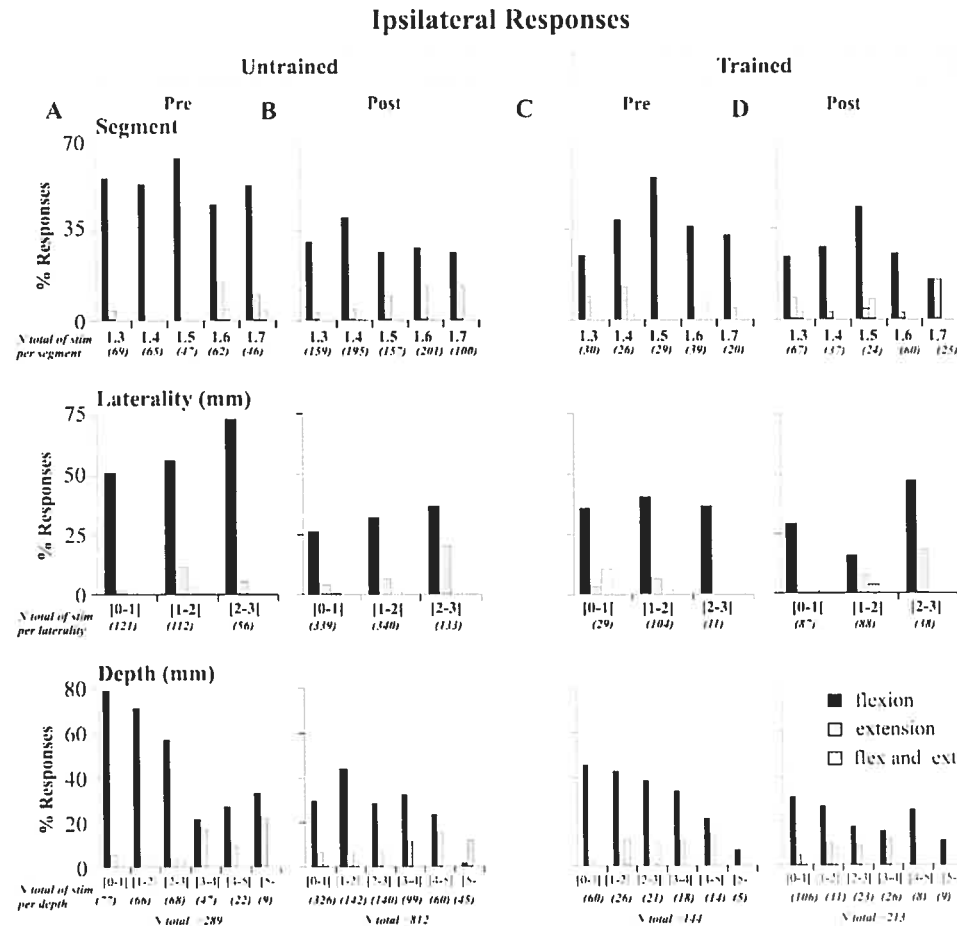
Stimulation is applied through a single electrode at rostral L3, 1 mm left of the midline after injection of clonidine in an untrained spinal cat. Stimulation starts at the dorsal surface (0) and stops around 5 mm below the dorsal surface (5). DREZ, Dorsal Root Entry Zone. The different responses (A,B,C,D) evoked along the stimulation track are coded in white, black and gray shades. The kinematics model indicates the angle measured. MTP is the metatarsophalangeal joint. The kinematics responses measured from video sequences are represented below in the sagittal plane for both hindlimbs (ipsilateral hindlimb with a black line; contralateral hindlimb with a gray line). The starting position of each limb is indicated by a dotted line of the corresponding shade. Arrows indicate the direction of the movement. Stim: 40  $\mu$ A, 300 Hz, 150 ms, 0.8 train/s.





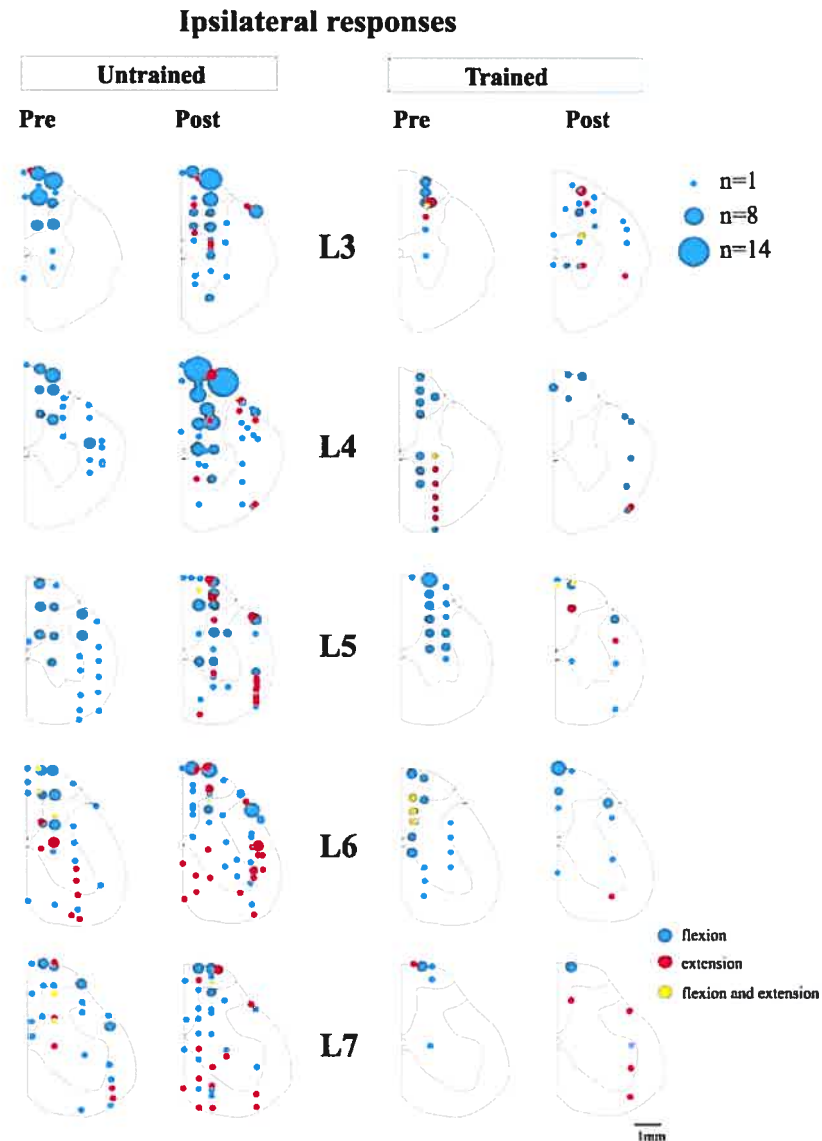
**Article1-Figure 3: Ipsilateral responses evoked in different spinal cats injected with clonidine**

A) Stick figure, joint angular displacement and EMG averaging of an ipsilateral flexion response ( $n=8$ ) evoked in the left hindlimb by stimulation applied in the dorsal part of L5, 1.5 mm left of the midline. Stim: 37  $\mu$ A, 300 Hz, 300 ms, 0.8 tr/s. B) Another pattern of ipsilateral flexion evoked in the same cat as in A and that resembles a locomotor swing phase. Stimulation was applied in the dorsal part of L5, 1.5 mm left of the midline. Stim: 37  $\mu$ A, 300 Hz, 300 ms, 0.8 tr/s. C) Extension response evoked in the left hindlimb by stimulation applied at mid-L7, 0.5 mm left of the midline, 2.5 mm below the dorsal surface. Stim: 40  $\mu$ A, 300 Hz, 150 ms, 0.8 tr/s. D) Flexion followed by extension is evoked in the ipsilateral hindlimb by stimulation at the junction of L4-L5, 1.5 mm left of the midline, 0.5 mm below the dorsal surface. Stim: 40  $\mu$ A, 300 Hz, 150 ms, 0.8 tr/s.



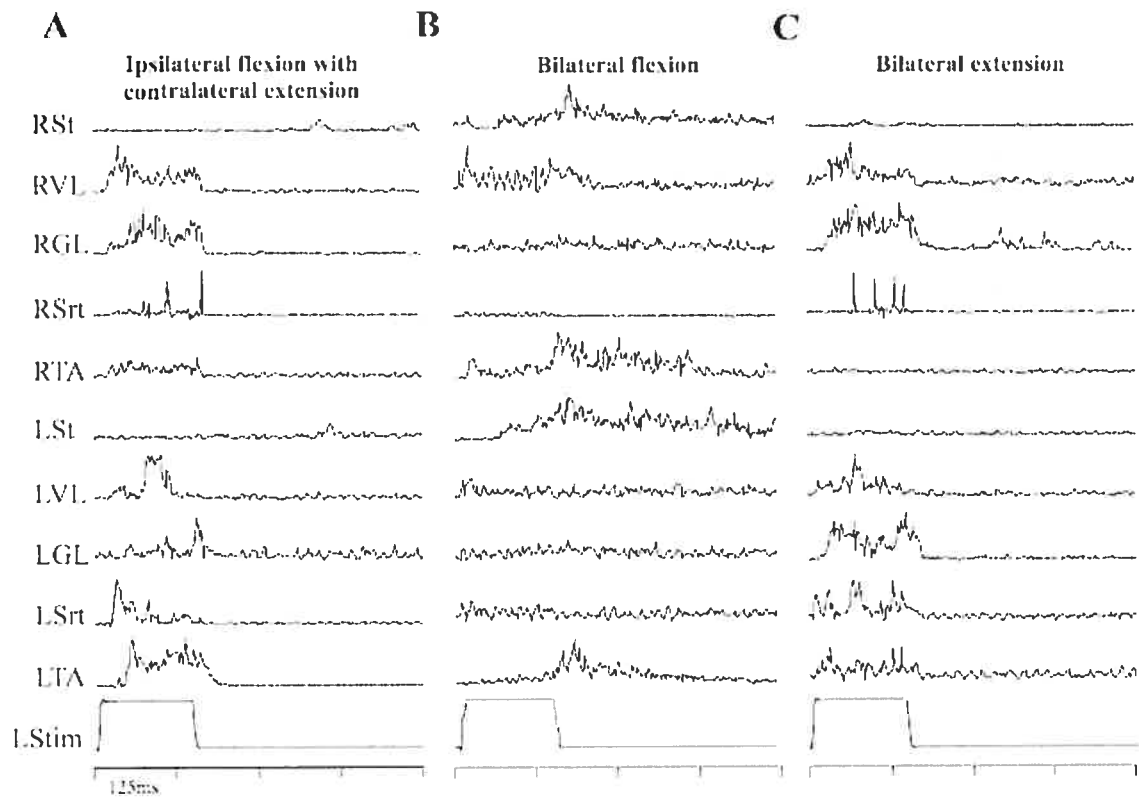
**Article1-Figure 4: Distribution of ipsilateral responses in the 4 conditions tested.**

Percentage of ipsilateral flexion responses (black), ipsilateral extension (gray) and ipsilateral flexion followed by ipsilateral extension (white) evoked by segment (top graph), laterality (middle graph) and depth (lower graph) in untrained spinal cats pre (A) and post-clonidine (B) and in trained spinal cats pre (C) and post-clonidine (D). The value of each bar represents the percentage of responses of one type out of all the other responses obtained by stimulating at that segment, laterality or depth respectively. The total number of stimulation sites (N total) is displayed below each group of bars. In the segmental distribution histogram (top graphs), responses obtained at various lateralities and depths were combined for each segment plotted on the X axis, thus only taking into account the criterion of segment. The same applies to the histogram of distribution per laterality (middle graph), where responses obtained at various depths and segments were combined for each of the laterality intervals plotted on the X axis, and for the depth distribution histogram (lower graph) where responses obtained at various lateralities and segments are combined and plotted for each of the depth intervals tested. The y axis of all the graphics were optimized to clearly show the differences between depths, segments or lateralities. The symbol [ in front of a number indicates the inclusion of the first number in the interval, while the same symbol following a number indicates the exclusion of that number from the interval.



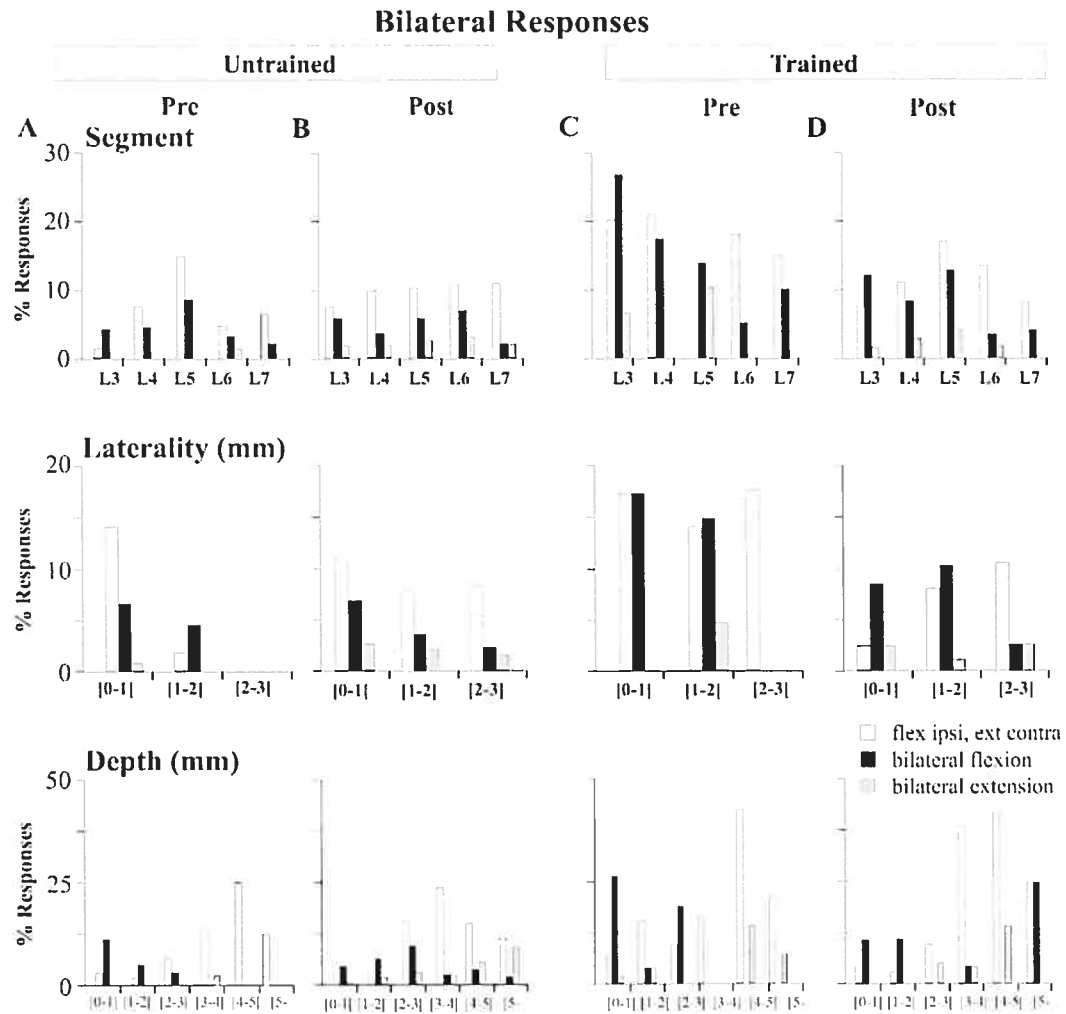
**Article1-Figure 5 Stimulated sites evoking ipsilateral responses in the 4 conditions tested**

Sites where ipsilateral flexion (blue), extension (red) and flexion followed by extension (yellow) were elicited in segments L3 to L7 in untrained spinal cat pre (A) and post-clonidine (B) and in trained spinal cat pre (C) and post-clonidine (D). Each dot represents an effective site. The size of the dot reflects the number of times a response was triggered from that locus.



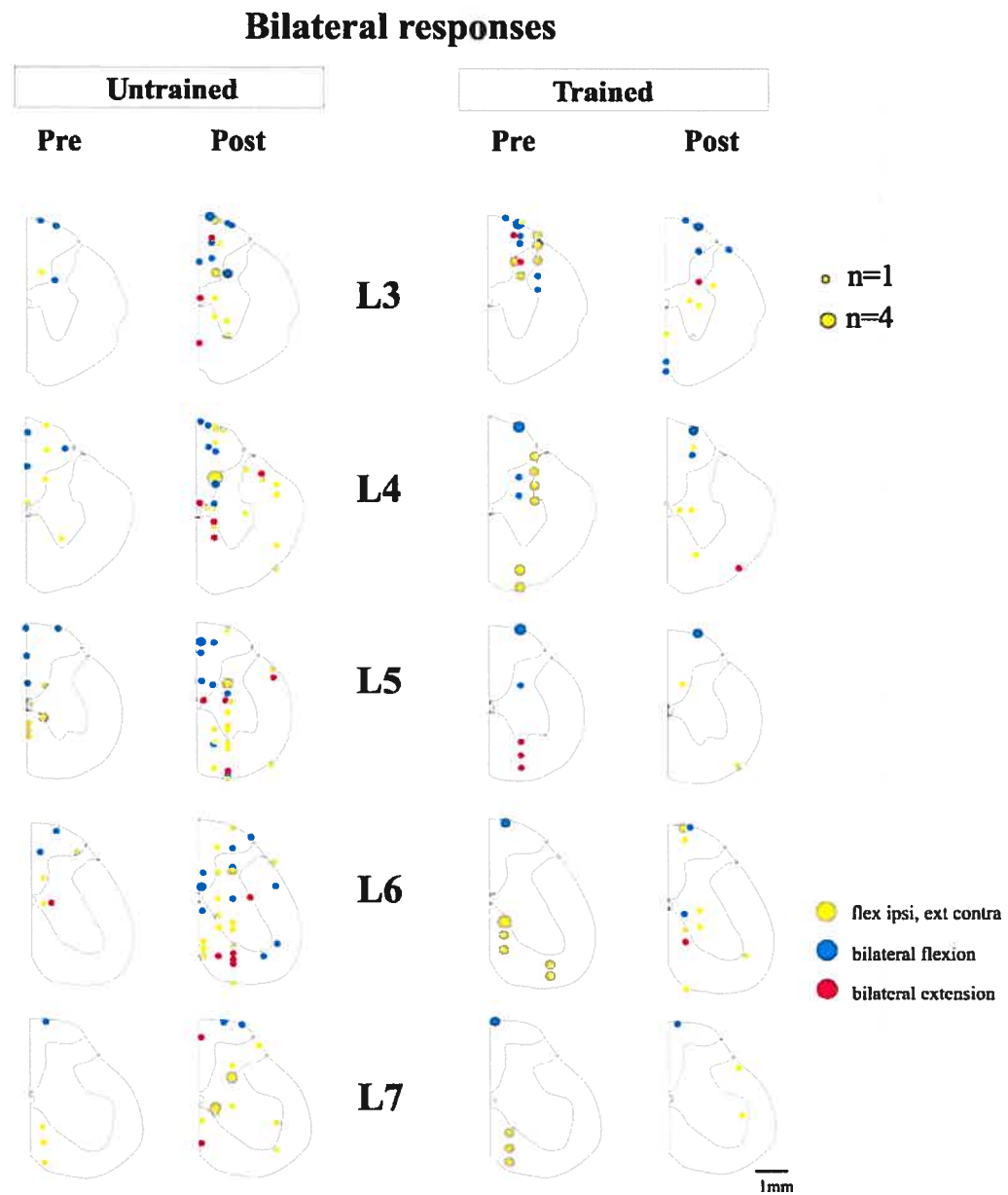
**Article1-Figure 6: Bilateral responses evoked in an untrained spinal cat with clonidine**

A) EMG averaging of ipsilateral flexion with extension evoked by stimulation applied in the dorsal part at the junction of L4 and L5, 0.5 mm left of the midline. Stim: 40  $\mu$ A, 300 Hz, 150 ms, 0.8 tr/s. B) Bilateral flexion evoked by stimulation applied in the dorsal part of mid L6 on the midline. Stim: 40  $\mu$ A, 300 Hz, 150 ms, 0.8 tr/s. C) Bilateral extension evoked by stimulation applied in mid L6, 1 mm left



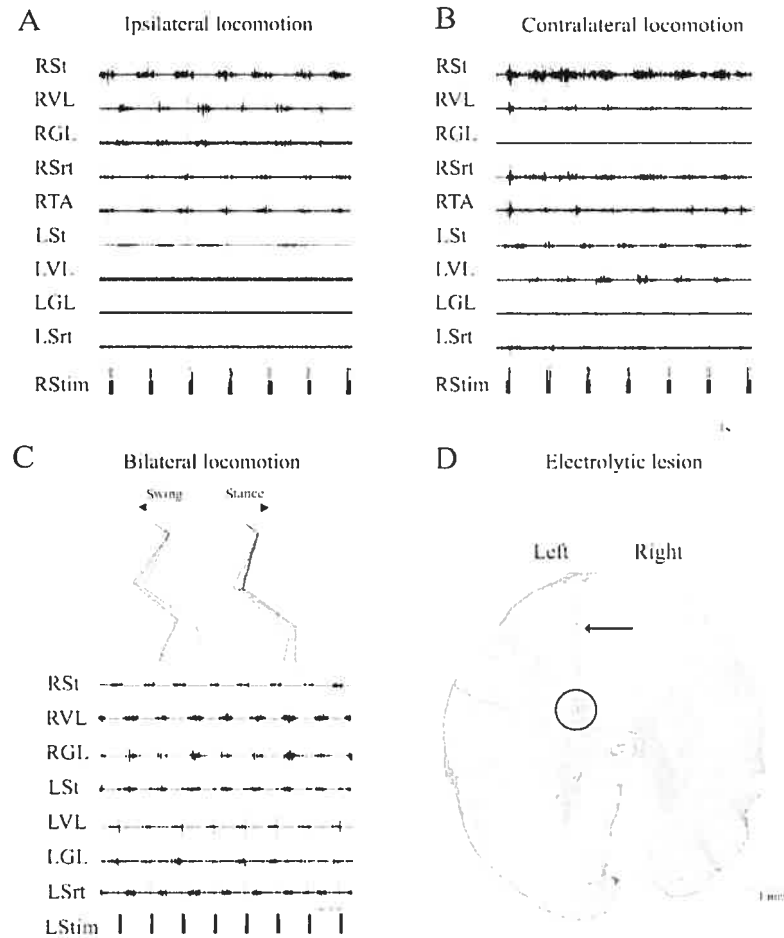
**Article1-Figure 7: Distribution of bilateral response in the 4 conditions tested**

Percentage of ipsilateral flexion with contralateral extension (white), bilateral flexion (black) and bilateral extension (gray) evoked by segment (top graph), laterality (middle graph) and depth (lower graph) in untrained spinal cats pre (A) and post-clonidine (B), and in trained spinal cats pre (C) and post-clonidine (D). Graphic reads as Fig. 4.



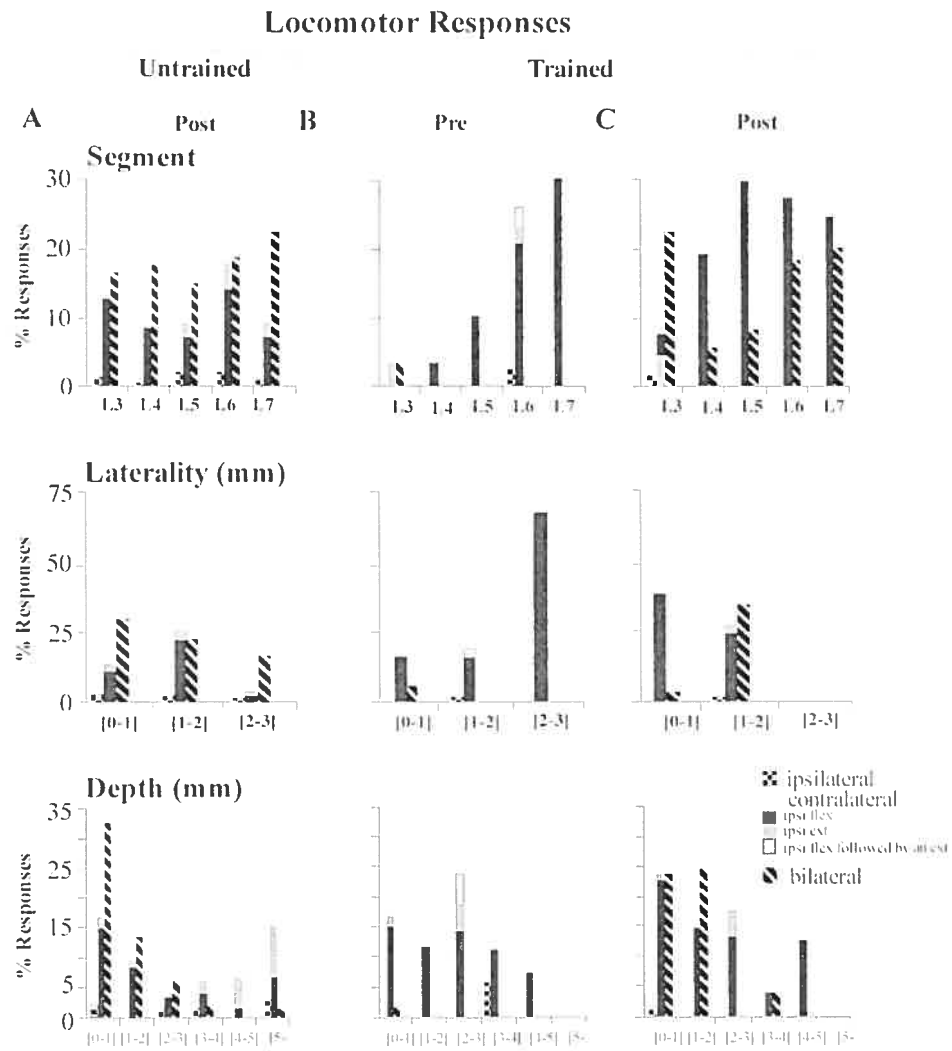
**Article1-Figure 8: Stimulated sites evoking bilateral responses in the 4 conditions tested**

Sites where ipsilateral flexion with contralateral extension (yellow), bilateral flexion (blue) and bilateral extension (red) were elicited in segments L3 to L7 in untrained spinal cats pre (A) and post-clonidine (B) and in trained spinal cats pre (C) and post-clonidine (D).



**Article1-Figure 9: Locomotor responses evoked in three different untrained spinal cats with clonidine**

A) EMG traces of ipsilateral locomotion activity induced with a stimulation applied at the dorsal surface of caudal L5, 1mm right of the midline. Stim: 50  $\mu$ A, 300 Hz, 150 ms, 0.8 tr/s. B) EMG traces of contralateral locomotion activity induced with a stimulation applied at mid-L6, 1.5 mm right of the midline, on the dorsal surface. Stim: 90  $\mu$ A, 300 Hz, 150 ms, 0.8 tr/s. C) Stick figure and EMG traces of bilateral locomotion evoked by a stimulation applied at the dorsal surface of Mid-L3, 1 mm left of the midline. Stim: 30  $\mu$ A, 300 Hz, 150 ms, 0.8 tr/s. D) Electrolytic lesion (circle) made 2 mm below the dorsal surface of segment L4 in a untrained spinal cat post-clonidine, 1 mm left of the midline. This site induced bilateral locomotion.

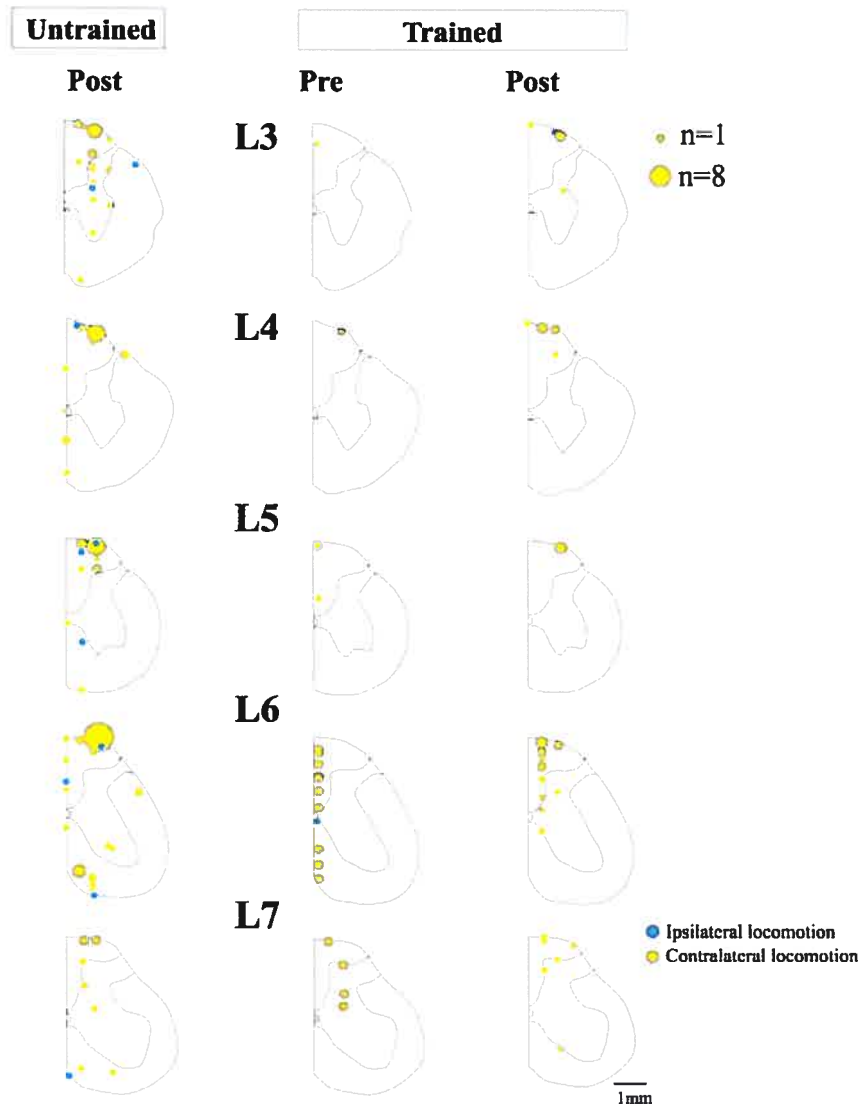


**Article1-Figure 10: Distribution of locomotor responses in the 4 conditions tested**

Proportion of ipsilateral locomotion (squared pattern), contralateral locomotion (solid bar) and bilateral locomotion (striped pattern) evoked by segment (top graph), laterality (middle graph) and depth (lower graph) in untrained spinal cats post-clonidine (A) and in trained spinal cats pre (B) and post-clonidine (C). Graphic reads as Fig. 4. Each bar of contralateral locomotion on the histograms is divided to represent the percentage of contralateral locomotion with ipsilateral flexion (black), with ipsilateral extension (gray) and with ipsilateral flexion followed by extension (white).



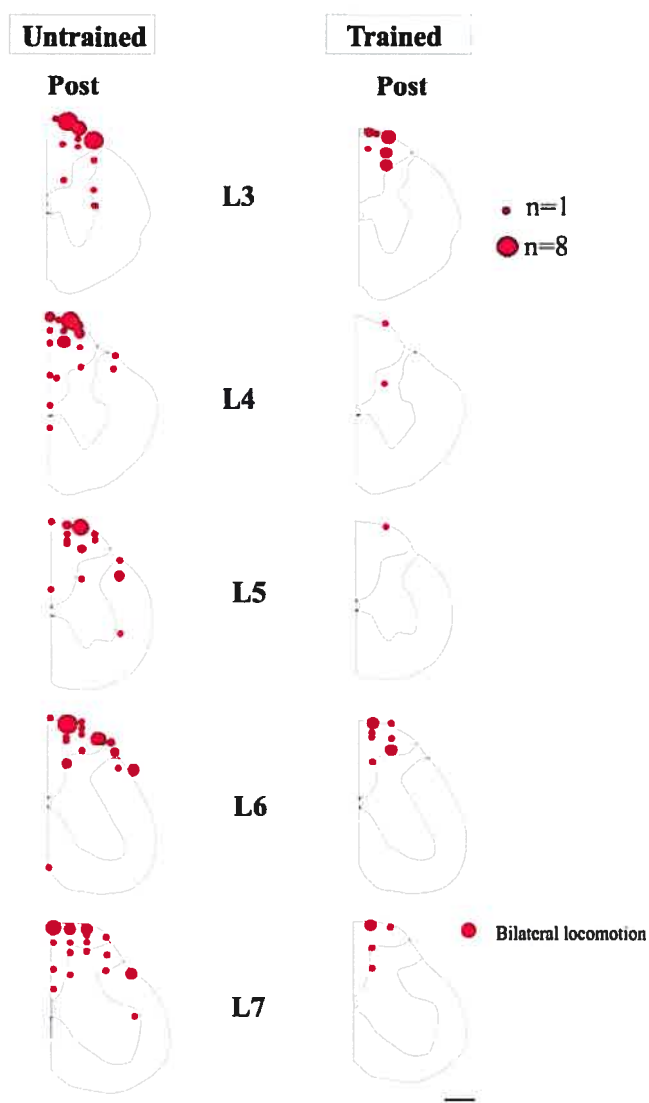
## Unilateral locomotor responses



**Article1-Figure 11: Stimulated sites that induced unilateral locomotor responses in the 4 conditions tested**

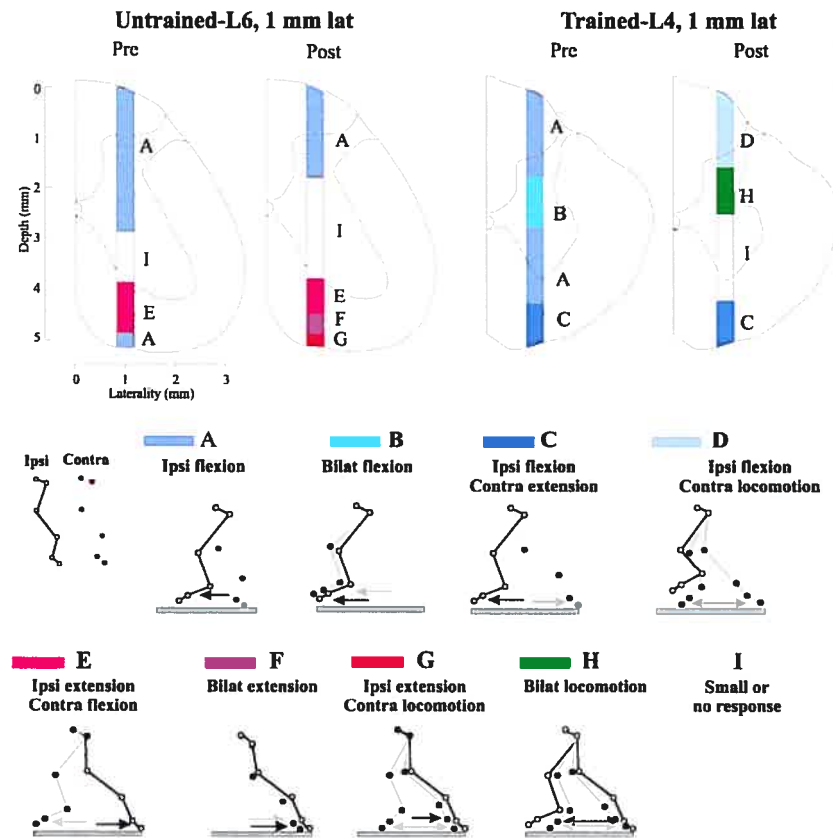
Sites where ipsilateral locomotion (blue) and contralateral locomotion (red) were elicited in segments L3 to L7 in untrained spinal cats post-clonidine (A) and in trained spinal cats pre (B) and post-clonidine (C).

# Bilateral locomotor responses



**Article1-Figure 12: Stimulated sites that induced bilateral locomotion in the 4 conditions tested**

Sites where bilateral locomotion (red) was elicited in segments L3 to L7 in untrained spinal cats post-clonidine (A) and in trained spinal cats post-clonidine (B).



**Article1-Figure 13: Responses evoked along a stimulation track in an untrained spinal cat pre and post clonidine and in a trained spinal cat pre and post-clonidine**

In the untrained cat, stimulation is applied at Mid-L6, 1 mm left of the midline, before and after injection of clonidine i.v. Stim: 40  $\mu$ A, 300 Hz, 150 ms, 0.8 tr/s. In the trained cat, stimulation is applied at Caudal L4, 1 mm left of the midline, before clonidine injection. Stim: 50  $\mu$ A, 300 Hz, 150 ms, 0.8 tr/s. After clonidine, stimulation is applied at Junction L4-L5, 1 mm left of the midline, after clonidine injection. Stim: 40  $\mu$ A, 300 Hz, 150 ms, 0.8 tr/s. The different responses evoked are color-coded on the spinal cord and refers to representation figures below the drawings that illustrate the responses induced in both ipsilateral and contralateral hindlimb. Arrows indicate the direction of the movement.

## Tables

**Table 1- Number of cats and stimulation tracks per condition**

Conditions	Untrained pre-clo	Untrained post-clo	Trained pre-clo	Trained post-clo
Number of cats tested (n)	6	12	3	5
Number of stimulation tracks	61	210	36	64

***Article1-Table 1- Number of cats and stimulation tracks per condition***

This table details the number of cats (n) and the total number of stimulation tracks made in those cats in each of the 4 conditions tested, namely untrained pre-clonidine, untrained post-clonidine, trained pre-clonidine and trained post-clonidine.

**Table 2. Distribution of responses per condition****Non-locomotor ipsilateral responses**

Conditions	Untrained pre-clo (N=6)	Untrained post-clo (N=12)	Trained pre-clo (N=3)	Trained post-clo (N=5)	
Responses	% of all sites (#cats)	% of all sites (#cats)	% of all sites (#cats)	% of all sites (#cats)	Mean %
Flexion	57 (6)	30 (12)	39 (3)	27 (5)	38
Extension	6 (4)	8 (8)	6 (3)	7 (4)	7
Flex follow Extension	2 (1)	1 (4)	4 (2)	2 (3)	3
Other responses	2 (2)	2 (5)	0	1 (1)	1
Faint or No response	20 (5)	12 (11)	N/A	10 (4)	14
Total	87	53	49	47	59

**Non-locomotor bilateral responses**

Conditions	Untrained pre-clo (N=6)	Untrained post-clo (N=12)	Trained pre-clo (N=3)	Trained post-clo (N=5)	
Responses	% of all sites (#cats)	% of all sites (#cats)	% of all sites (#cats)	% of all sites (#cats)	Mean %
Ipsi flex Contra ext	6 (2)	9 (11)	15 (3)	10 (4)	10
Bilateral flexion	5 (4)	5 (8)	15 (3)	8 (3)	8
Bilateral extension	<1 (1)	2 (9)	4 (2)	1 (3)	2
Other responses	1 (1)	2 (4)	0	<1 (1)	1
Total	12	18	34	19	21

### Locomotor responses

Conditions	Untrained pre-clo (N=6)	Untrained post-clo (N=12)	Trained pre-clo (N=3)	Trained post-clo (N=5)	
Responses	% of all sites (#cats)	% of all sites (#cats)	% of all sites (#cats)	% of all sites (#cats)	Mean %
Ipsilateral locomotion	<1 (1)	1 (5)	1 (1)	<1 (1)	1
Contralateral locomotion	0	11 (9)	15 (3)	17 (3)	11
Bilateral locomotion	0	17 (8)	1 (1)	16 (4)	9
Total	1	29	17	34	20
<b>% Total responses</b>	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>100</b>

#### *Article1-Table 2-Distribution of responses per condition*

This table details the responses obtained for each condition as well as the number of cats tested in each condition in brackets (N=). The first part details the non-locomotor ipsilateral responses, the second part, the non-locomotor bilateral responses and the third part, the locomotor responses. For each type of responses, the percentage obtained in that preparation is displayed as well as the number of cats in which that response was triggered in brackets. Those data are displayed for the four preparations tested. The last column corresponds to the mean percentage of that response across preparations. The last line (in bold) corresponds to the sum of all responses (in %) in a given preparation. N/A: not assessed.

## CHAPITRE III - ARTICLE #2

---

### **Characteristics and mechanisms of spinal locomotion induced by intraspinal microstimulation and dorsal root stimulation**

By

*Dorothy Barthélemy, Hugues Leblond and Serge Rossignol*

Groupe de recherche sur le système nerveux central,  
Département de Physiologie, Pavillon Paul-G.-Desmarais, Université de Montréal,  
Montréal (Québec), Canada H3T 1J4

**Sera soumis à Journal of Neurophysiology**

## Article2

### **Characteristics and mechanisms of spinal locomotion induced by intraspinal microstimulation and dorsal root stimulation**

**By**

***Barthélemy.D., Leblond H. and Rossignol S.***

Centre de recherche en sciences neurologiques,  
Département de Physiologie, Pavillon Paul-G.-Desmarais, Université de Montréal,  
Montréal (Québec), Canada H3T 1J4

Sera soumis à Journal of Neurophysiology



## Abstract

Intraspinal microstimulation (ISMS) through a single microelectrode can induce locomotion in untrained one-week spinal cats (T13) and on cats that were trained to walk on the treadmill (3 to 5 weeks post-spinalization). In this paper, we first studied the optimal parameters of ISMS and the characteristics of locomotion evoked. ISMS was applied in the dorsal region of segments L3-S1, at different lateralities (from midline to 2.5 mm laterally) and after an i.v. injection of clonidine (noradrenergic agonist). We used kinematics and electromyographic recordings to characterise locomotion. ISMS could induce bilateral locomotion that resembles the one obtained with perineal stimulation and the characteristics of locomotion varied according to the spinal segment stimulated. We then investigated how ISMS could evoke locomotion by stimulating, inactivating or lesioning different spinal structures. Dorsal root (DR) stimulation could evoke locomotion which suggests that afferent pathways are probably involved in the production of locomotion by ISMS. Entrainment of the locomotor pattern by ISMS and DR stimulation was seen within a limited range of frequency and intensity of stimulation. Microinjections of yohimbine, a noradrenergic antagonist, in L3 and L4 segments or a second complete spinal lesion at L3 or L4 abolished all locomotor activity evoked by ISMS applied at more caudal segments. Progressive dorsoventral spinal lesions at L3 or L4 and restricted ventral lesions at L4 suggest that the integrity of the ventral or ventrolateral funiculi as well as the L3-L4 segments is critical for the induction of locomotion by ISMS at L5 to S1 or DR stimulation.

**Key words :** intraspinal microstimulation, dorsal root stimulation, clonidine, locomotion, entrainment, yohimbine, spinal lesion

## Introduction

A number of studies have shown that bilateral locomotion of the hindlimbs can be induced by electrical stimulation of the spinal cord. Grillner and Zangger (1979) induced locomotion with stimulation of the dorsal columns. Using epidural and subdural stimulation of segments L1 to L4 or L5 to S1, Iwahara et al (1991b) triggered bilateral locomotion in cats spinalised at the midthoracic level. Gerasimenko et al (2003; 2005) were also successful at inducing locomotion with epidural stimulation applied at the border of L4-L5 in decerebrate and spinalised (T10-12) cats. This was also shown in the rat (Iwahara et al., 1991b; Ichiyama et al., 2005) and human (Minassian et al., 2004; Shapkova and Schomburg, 2001). Using intraspinal microstimulation (ISMS), Saigal et al. (2004) stimulated through multiple electrodes located in the ventral horn of acutely decerebrated, chronically spinalized cats. The electrodes aimed at various motoneuronal pools on both sides of the cord and were efficient to induce bilateral locomotion by phasic stimulation through electrodes generating flexor or extensor movements. With a single electrode, Tai et al (2003) induced movements of the whole hindlimb (flexion, extension, abduction and adduction) in anaesthetised cats and concluded that only a few microelectrodes were necessary to achieve functional hindlimb movements (Tai et al., 2003). Lemay and Grill (2004) came to a similar conclusion, using endpoint force measurements.

The possibility of triggering full locomotor synergies through stimulation of only one electrode has distinct advantages. In a previous paper, we have shown that stimulation through a single electrode at dorsal spinal sites was sufficient to induce bilateral locomotion in spinal cats (Barthélemy et al, submitted). In the present paper, the optimal parameters to induce such spinal locomotion as well as the characteristics of the locomotion evoked with different types of stimulations, are defined more extensively. The effect of locomotor training and chronicity on the locomotion in spinal cats that were not trained (1 week) and those that were trained on a treadmill (3-5 weeks) were compared. Furthermore, since stimulation at different sites of the spinal cord can generate locomotion, establishing a correlation between the characteristics of locomotion and stimulation sites may provide insights into the spinal neuronal networks activated by ISMS.

The preceding paper also showed that the optimal sites to induce locomotion by ISMS were in the dorsal and dorsolateral funiculi as well as in the dorsal horn and it was suggested that these efficient stimulation sites were probably activating afferent pathways or interneurons normally contacted by afferents (Barthélemy et al, submitted). The activation of pathways using dorsal root (DR) afferents has been postulated in the work using epidural stimulation and has been shown directly by others. Grillner and Zangger (1979) showed that bilateral locomotion could be achieved by stimulating bilaterally the DR, or the dorsal columns, in a spinal cat injected with Nialamide and L-Dopa. More recently, in the *in vitro* neonatal rat preparation, Marchetti et al (2001) evoked bilateral locomotor activity by applying electrical stimuli to a single DR. The present study provides the opportunity to compare, in the same preparation, locomotion induced by ISMS and by DR stimulation at the same segmental level.

Therefore, the first part of this paper reports on the characteristics of locomotion and optimal parameters of effective ISMS and DR stimulation in cats spinalized one to five weeks earlier. It will be shown that locomotion triggered by both types of stimulation is similar, which suggests that they use common activation pathways to induce locomotion.

This paper takes a more detailed look at the mechanisms and the pathways that are needed to induce locomotion by ISMS or DR stimulation. Indeed, although it can be activated, little is known about the localization of this spinal locomotor network in mammals, especially in cats. Studies in the neonatal rat have suggested that the spinal locomotor network is distributed along the spinal cord (Cowley and Schmidt, 1997). Other studies in the neonatal rat (Kjaerulff and Kiehn, 1996) and in the turtle (Mortin and Stein, 1989) also proposed a distributed network with more excitable rostral lumbar segments playing a leading role in the organization of the locomotor pattern. It was even suggested that rostral segments L1-L2 could provide the necessary command for the generation of the hindlimb locomotor pattern in the neonatal rat (Cazalets and Bertrand, 2000). Such an organization has also been suggested in the adult rat since kainic acid lesions destroying the gray matter in rostral segments abolish locomotion (Magnuson et al., 1999).

Similarly, in acute experiments on one-week spinal cats (T13), it was shown that microinjections of clonidine restricted to the midlumbar segment L3 or L3 and L4 was sufficient to induce bilateral locomotor rhythms on a treadmill and microinjections of

alpha2-noradrenergic blocker yohimbine at L3-L4 could block locomotion induced by clonidine i.v. (Marcoux and Rossignol, 2000). Microinjections of only L6 segment or L6 and L7 segments did not evoke measurable steps. Those results were reproduced in conditions of fictive spinal locomotion (Leblond et al., 2001). Furthermore, chronic spinal cats (T13) that had recovered locomotion on a treadmill, stopped walking after a second chronic spinal lesion at L4, even after several weeks of retraining post-injury (Langlet et al., 2005).

In our previous paper, we reported that ISMS of the dorsal region of all segments could trigger locomotion in trained and untrained cats with clonidine, and that electrical stimulation of the mid-lumbar segments did not evoke locomotion more preferentially than other segments (Barthélemy et al., submitted). However, in this paper, we show that inactivation of mid-lumbar segments by yohimbine or sections at L4 including ventral pathways abolished locomotion evoked by ISMS and DR of more caudal segmental levels. Part of this work has been published as abstracts (Barthélemy et al., 2005b; Barthélemy et al., 2002).

## Methods

Twenty-three cats of either sex (3.1-6.7 kg) were used for this study. Eighteen of these cats were spinalized 5-7 days before the acute experiment and were not trained on the treadmill. The remaining 5 cats were spinalized and trained to walk on the treadmill (10 minutes, 3 times/day, 5 days/week) until they recovered spontaneous hindlimb locomotion on the treadmill i.e. three (n=2), four (n=1) and five weeks (n=2) before the acute experiment. These were the same cats used in the first paper (Barthélemy et al, submitted). All procedures were conducted according to the *Guide for the Care and Use of Experimental Animals* (Canada), using protocols approved by the Ethics Committee of Université de Montréal.

All the animals sustained a spinal section at the thoracic 13 level (T13). The methods used in this paper are mostly described in the preceding paper (Barthélemy et al, submitted). We will thus limit the description of the methods to more specific aspects relevant to this paper.

### Acute experiments

Under general anesthesia, one carotid artery was cannulated for monitoring blood pressure and the other one was ligated. One jugular vein was cannulated for the administration of fluid and medication. The temperature was measured with a rectal thermometer and maintained around 38°C by a feedback-controlled heating element using direct current and with heating lamps if necessary. The end-expiratory pCO<sub>2</sub> was monitored using a Datex Monitor during normal or assisted ventilation and maintained between 3.5 and 4.5%. Cats maintained their blood pressure within the normal range; in two cases Levophed was given to correct a low pressure. A laminectomy of L3 to L6 vertebrae exposed the spinal cord segments from L3 to S1 and the cats were then mounted on a spinal contention unit over a motor-driven treadmill. To ensure stability of the spinal cord for subsequent exploration with intraspinal stimulation, the spine was fixed with three pairs of lateral pins: one pair on the L1 pedicles, one on those of L4 or L5 and the other on the iliac crests. Although such a sturdy fixation was necessary to insure repeatability of stimulation at the same site, it could limit the amplitude of the movement and provide a noxious input

that may interfere with the full expression of the locomotor pattern. A precollicular, post-mamillary decerebration was performed with a narrow spatula and the rostral nervous tissue was aspirated. Anesthesia was then discontinued. In some cases, assisted ventilation had to be used after decerebration. The dura was opened and the spinal cord covered with warm mineral oil. The spinal segments were determined by identifying the most rostral and caudal rootlets of each dorsal root.

#### Intraspinal electrical stimulation

ISMS using a custom-designed stimulating software and a linear stimulus isolator unit (world precision instruments; model A395) was applied monopolarly to the spinal cord with a single tungsten electrode insulated except for the tip (around 1-2  $\mu\text{m}$ , impedance 0.08 to 0.1  $\text{M}\Omega$ ; in 5 cats, electrodes of 5-20  $\text{M}\Omega$  were used). The indifferent electrode was inserted into back muscles. Biphasic pulses (10-90  $\mu\text{A}$ , 250-500  $\mu\text{s}$ ) were delivered either as single pulses with varying frequencies (1-300 Hz) or as trains of 50-500 ms duration with an intra-train frequency of 70-500Hz and a rate of 0.3-2 trains/s. The stimulation was applied one site at a time in different parts of the dorsal, lateral, and ventral areas of the L2 to S1 segments and from the midline to 2.5 mm on either side. However, we concentrated on segments L3 to L7, stimulating both left and right sides of the cord from the first rootlet of L3 to the last rootlet of L7, by steps of 0.5 mm. At each stimulating entry point, we descended the electrode mounted on a manipulandum while the stimulation was continuously on, but stopped every 0.5 mm to assess the effects at that point.

Dorsal root stimulation (10-300  $\mu\text{A}$ ) was applied with a bipolar hook electrode in 3 cats. The dorsal rootlets were cut as distally from the spinal cord as possible and put on the hook of the electrode. They were bathed in warm mineral oil. Those experiments were used to compare dorsal root stimulation and intraspinal stimulation at the same spinal segment.

#### Experimental protocol

At least one hour elapsed between the cessation of anesthesia and the start of stimulation. First, the locomotor capacity of all cats was evaluated on the treadmill at a speed of 0.2 m/s while using perineal and/or abdominal manual stimulation. Second, the

ability of electrical microstimulation to induce locomotion by itself, i.e. without drugs, was tested in 5 animals. After having tested locomotor capacities pre-drug, we injected clonidine i.v. (500  $\mu\text{g/kg}$ ) to those 5 animals to determine if the ability of electrical stimulation to trigger locomotion could be improved. In all the other cats ( $n=13$ ), clonidine was injected i.v. (500  $\mu\text{g/kg}$ ) before we tested the effects of electrical stimulation. Only the data obtained after clonidine was injected will be presented in the present paper. Clonidine was used because noradrenergic agonists have been found to be the most efficient to initiate locomotion in spinal cats on a treadmill (Barbeau and Rossignol, 1991; Chau et al., 1998a; Forssberg and Grillner, 1973). In 5 cats, Naloxone was also injected i.v. (700  $\mu\text{g/kg}$ ) to potentiate the effects of clonidine (Pearson et al., 1992a). We used those preparations to further experiment on the optimal parameters, location of stimulation and characteristics of the evoked locomotion. No difference between the results of cats that received clonidine only and those that received clonidine with naloxone was observed.

In this study we also investigated the importance of midlumbar segments L3-L4 in the initiation of locomotion, as well as the pathways activated by the stimulation. In two cats, yohimbine (an  $\alpha_2$ -noradrenergic blocker, 8mg/ml; (Marcoux and Rossignol, 2000)) was injected intraspinally. The injections of 2.5  $\mu\text{l}$  each were given using a Hamilton syringe (26 gauge needle; Hamilton, Reno, NY) inserted 2 mm deep paramedially (1 mm on each side of the midline) in the segments L3 and L4 ( $n=1$ ) or only in L4 ( $n=1$ ). Eight to ten injections per segments were made to cover the whole segment bilaterally. Yohimbine was used to test if inactivating the mid-lumbar segments could block locomotion triggered by electrical stimulation of more caudal segments.

We also applied a bilateral rhizotomy at L3-L4 in one cat and successive spinal lesions were performed in 13 cats at L2, L3 and L4. After each spinal lesion, electrical stimulation was applied to more caudal regions. If the portion of the spinal cord left intact was sufficient to produce bilateral locomotion, then another lesion was performed in the next caudal segment. The spinal lesions were applied progressively either dorsoventrally or ventrodorsally and after each partial section, locomotor output was assessed until no locomotion could be triggered by the stimulation of more caudal segments. At the end of the experiments, electrolytic lesions were made in locations which successfully triggered

locomotion (n=5) and all cats were sacrificed by an overdose of Sodium Pentobarbital i.v. The spinal cord was then removed for histology.

### **Recordings and analysis**

Kinematics and EMG recordings were important parts of the analysis to determine if bilateral locomotion was induced. We considered a complete step cycle to consist of a stance and a swing phase. The stance phase begins as soon as the foot contacts the treadmill belt and terminates when the foot starts its forward movement. The swing phase starts at this point and terminates as the foot strikes the treadmill belt again, or as the hindlimb initiates a downward and backward movement when a foot drag is present. Foot drag is common after spinalization and consists of an inadequate clearance of the foot during swing. It is defined as the initial period during which the tip of the toes drag on the treadmill belt during the forward movement of the foot. Step cycle duration was defined as the time elapsed between the beginning of the foot lift or the forward movement to the next similar event. Activity was considered to be locomotor only when there was an alternation between flexor and extensor muscles in a hindlimb, an out-of-phase alternation with the other hindlimb and a forward and upward movement during the swing phase of the cycle.

### **Statistics**

Differences between measures of cycle duration were compared with Student's *t*-test and were considered to be significant if the probability of a type error was  $< 0.05$ .



## Results

### Optimal stimulation parameters to induce locomotion

Data come from locomotor sequences induced in spinal cats with clonidine or with clonidine and naloxone. Perineal stimulation could induce locomotion in the 23 cats tested, and electrical stimulation could evoke bilateral locomotion in 21 of those cats.

#### **Perineal stimulation**

The kinematic and EMG activity of locomotion induced with perineal stimulation as well as intraspinal electrical stimulation is displayed in Figure 1 for one untrained spinal cat. In Fig. 1A, there is a forward and upward movement during the swing phase of locomotion induced by perineal stimulation, and the cat drags his paw on the treadmill at the beginning of the swing phase. Paw drag is commonly seen during locomotion in spinal cats. The corresponding angle averaging of 7 consecutive step cycles also shows that the movement occurred at all joints of the left hindlimb during this locomotor sequence. The total excursion for the hip, knee, ankle and MTP is  $20 \pm 1$ ,  $15 \pm 1$ ,  $32 \pm 2$  and  $32 \pm 3$  degrees respectively. EMG activity shows clear alternation between flexor and extensor muscles of each limb as well as between left and right hindlimbs.

#### **Tonic ISMS**

Sustained locomotor activity on the treadmill (0,2 m/s) is also obtained by tonic stimulation at low intensity (20-90  $\mu$ A) and low frequencies (2-6 Hz), when applied in the dorsal area of the spinal cord and at all lateralities tested, from the midline to 2.5 mm laterally. Tonic stimulation could induce locomotor activity in 9 out of the 16 cats in which it was tested. In Figure 1B, the stick figures show the excursion of the left hindlimb during swing and stance, when stimulation is applied at the L3 segment, 1.5 mm left of the midline. It is smaller than what is observed with perineal stimulation and the paw drag is more pronounced. The averaged angular excursion of 9 consecutive step cycles illustrates some decrease in excursion of the joints with tonic stimulation. Indeed, the total excursion for the hip, knee, ankle and MTP is  $11 \pm 0.6$ ,  $13 \pm 1$ ,  $29 \pm 2$  and  $40 \pm 5$  degrees respectively, thus the diminished angular excursion is mainly at the hip. EMG bursts are well defined

and organized, and the alternation between flexor and extensor muscles on the left and right hindlimb is clear. There is also a well defined reciprocal activity between muscles of the left and right hindlimbs.

Although low frequencies were found to be optimal, bilateral locomotion was also triggered at 30, 70 and 100 Hz, but only lasted for a few cycles. Stimulation at higher frequencies than 100 Hz (we tested 150, 200 and 300 Hz) were not as efficient in this preparation.

### **Stimulation with trains**

Trains of stimulation also evoke a regular bilateral and alternating locomotor pattern in all segments. In Figure 1C, stimulation is applied in segment L4, 2 mm left of the midline. The stick figure resembled that of tonic electrical stimulation. The angular excursion at the hip and also at the other joints is diminished from locomotion induced by both perineal and tonic stimulation and the locomotor movement mainly occurs at the ankle. Indeed, the total excursion for the hip, knee, ankles and MTP is  $7\pm1$ ,  $14\pm2$ ,  $26\pm4$  and  $17\pm3$  degrees respectively. EMG activity reflects the rhythmic alternation between flexor and extensor muscles of both limbs as well as left and right hindlimbs. Note that although the frequency of the trains and the frequency of the step cycle are very close (see later for entrainment), the stimulus train does not clearly trigger a burst in the ipsilateral flexor muscle LSt.

The optimal train duration was found to be between 150 and 300 ms. Different intra-train frequencies were tested (50 to 500 Hz), but 50 Hz was used more commonly. We tested inter-train frequency from 0,3 to 2 trains/s and found that the window between 0,65 and 1 train/s was optimal to induce bilateral locomotion with the treadmill speed used (0,2 m/s). At higher frequencies, locomotion could be induced in the contralateral hindlimb only and short latency responses (mainly flexion of the hindlimb) would be observed in the ipsilateral leg. At lower frequencies, short latency responses (mainly flexion) were induced in the ipsilateral hindlimb only. Train stimulation was efficient to induce locomotion when applied in dorsal areas of all segments tested, from L2 to S1.

### **Intensity of the stimulation**

For both tonic and trains of stimulation, bilateral locomotion was achieved at low intensity (20-90  $\mu\text{A}$ ). However, this intensity is high compared to the motor threshold determined by observing hindlimb movements which is typically at around 5 to 15  $\mu\text{A}$ , depending on the region stimulated and the state of the spinal cord. For example, when stimulation was applied in the dorsal part of Mid L6, 1.5 mm from the midline in a one week spinal cat, motor response in the ipsilateral hindlimb can be detected at 5  $\mu\text{A}$ . From 5 to 19  $\mu\text{A}$ , the ipsilateral response becomes stronger with the increasing intensity. At 20  $\mu\text{A}$ , motor response is observed in both hindlimbs simultaneously and in synchrony with the stimulation. At 40  $\mu\text{A}$  contralateral locomotion is recorded and bilateral locomotion is triggered from 40 to 50  $\mu\text{A}$ . Stimulating at higher intensities than 50  $\mu\text{A}$  did not induce locomotion and induced ipsilateral flexion instead. Those intensity values are not absolute and vary from one cat to another.

### **Unilateral locomotor activity**

Contralateral locomotor activity was triggered by electrical stimulation, be it tonic or trains of pulses, in the 23 cats of this study. The example in Figure 2 shows that the stimulation induces an alternation between flexor and extensor muscles of the hindlimb (right) contralateral to the stimulation (left). In the ipsilateral hindlimb, only a burst in LSt was observed, which was expressed as a flexion of the hindlimb. Note that its onset is out of phase with that of RSt. Throughout the experiments, contralateral locomotor activity was the most frequently observed locomotor event and was elicited by stimulation of all segments tested. Often, once contralateral activity was observed, slightly moving the electrode up or down by a few microns or slightly increasing the amplitude of the stimulation could trigger rhythmic discharges in ipsilateral extensor muscles and induce bilateral locomotor activity. Ipsilateral locomotion was rarely induced alone with this paradigm.

### **Characteristics of bilateral locomotion induced by ISMS**

#### **Induction of locomotion**

The majority of bilateral locomotor bouts induced by tonic and trains of electrical stimuli followed two main patterns of onset. In the first pattern (Fig. 3A), alternation between flexion and extension is only observed in the contralateral side and ipsilateral flexor (LSrt) muscles are firing rhythmically and out of phase with the contralateral flexor muscles. When the ipsilateral extensor muscles start bursting rhythmically and out of phase with ipsilateral flexor muscles, bilateral locomotion can be observed. The delay between alternation of the contralateral hindlimb only and bilateral locomotion varies and, as said previously, moving the electrode up or down slightly in the efficient dorsal area was often necessary to trigger a bilateral locomotor sequence. The second most frequent pattern of induction starts with a burst in the contralateral extensor and ipsilateral flexor muscles simultaneously (Fig. 3B). Then contralateral flexor and ipsilateral extensor muscles fire simultaneously to produce bilateral locomotion. Thus, locomotion can start in the contralateral hindlimb or in both limbs simultaneously. Both those patterns were observed in similar proportion in locomotion induced by tonic and train stimulation. Also, when stimulation was applied in a locomotor site, a delay varying from a few milliseconds to about 15 seconds was needed before bilateral locomotion was fully organized. In these experiments, numerous trials were necessary to find a location that triggers organized bilateral activity but once it was found, we could go back to that spot regularly and evoke locomotion again.

### **Interlimb and intralimb coupling**

Comparison of the interlimb coupling and intralimb coupling were made between locomotion induced by perineal stimulation and ISMS (Table 1). Interlimb coupling was measured using both flexor and extensor muscles. In general, values for interlimb coupling were similar for both means of stimulation. However in one cat (cat#2), standard deviation and the % of variation, which is the standard deviation put in %, is higher for ISMS. Thus the locomotor cycles were not as regular with ISMS as with perineal stimulation in this cat. In the 2 other cats, variation in the locomotor cycles were similar in locomotion induced by both means of stimulation. Intralimb coupling values were also varied and differences were observed between right and left hindlimb, leading to a somewhat asymmetrical gait induced with both perineal stimulation and ISMS. Based on

the % of variation however, locomotion evoked with ISMS on one side would be more asymmetric.

### **Effect of locomotor training**

To determine if the locomotor pattern evoked by ISMS was better after training, interlimb coupling and intralimb coupling measurements were made for locomotion induced with ISMS and perineal stimulation in trained spinal cats (Table 2). As for untrained cats, the locomotion evoked depended on the cat. In cat #5, standard deviation is small for interlimb coupling and intralimb coupling during perineal stimulation. Though those values are higher for ISMS, they are still lower than the % of variation observed in the 3 untrained spinal cats displayed in table 1. Data from cat #4 and cat #6 were also generally lower than what was observed in the untrained spinal cat, but the difference is less pronounced. However, for each cat, ISMS seems to induce locomotion with a higher % of variation than perineal stimulation.

### **Effect of the segment stimulated and the laterality**

Locomotion could be induced in all segments tested (L2-S1) as well as in all lateralities tested (midline to 2.5 mm laterally), with a higher occurrence medially (Barthélemy et al, submitted). To determine the effect of the localisation of the stimulation on the locomotion, the kinematics of the locomotor movements were first analyzed. During locomotion induced by stimulation of more rostral segments, the hindlimb ipsilateral to the stimulation touched the treadmill further in front of a vertical axis passing through the hip at the end of the swing than in locomotion induced in more caudal segments. Alternatively, the ipsilateral hindlimb would start the swing phase when the toe is further behind the hip axis when the locomotion is induced by stimulation of more caudal segments.

Indeed, in the cat displayed in Fig. 4, stimulation is given at the same laterality on the left side of the cord, in segments L3 to L7. In Figure 4A, the position at which the hindlimb contacted the ground ( $\diamond$ ) and lifted from the ground ( $\square$ ) is displayed for each segment stimulated, as well as for perineal stimulation. At L4, the toe contacts the treadmill at about 3.3 cm in front of the hip at the end of the swing and the toe lifts up from the treadmill at the end of the stance at around 5 cm behind the hip axis. Stimulation of more

caudal segments seems to decrease the amplitude of the excursion in front of the hip during swing, while increasing the excursion of the leg behind the hip during stance. Furthermore, the trajectory of the swing also suggests a higher excursion of the leg during the swing with a stimulation induced more rostrally at L3, compared to a stimulation applied at L7 (Fig. 4B).

The duration of the step cycle as well as its sub-phases varies slightly but not significantly for each of those locomotor sequence evoked from various segments as well as in perineal stimulation (Figure 5A). However, the total excursion length of the leg during the step cycle and within each phase remains stable in all segments stimulated as well as in perineal stimulation (Fig. 5B). This analysis was done on the three cats that exhibited the best bilateral locomotion at all segments. Out of those three cats, this tendency was observed in two of them while no tendency was observed in the third one.

Contralateral hindlimb movements do not show a similar trend between kinematic of the hindlimb and the segment stimulated. Furthermore, to determine if the differences in the locomotor pattern was due to the laterality of our stimulation, different lateralities were compared within rostral and caudal segments. Though a tendency between stimulation at lateral sites and a more forward contact point seemed present, it was not found to be significant.

### **Effect of frequency of stimulation**

The frequency of the locomotor cycle induced is related to the frequency of tonic stimulation. However, this is even more obvious with trains of stimulation, where locomotor frequency often matched the stimulation rate. This possible entrainment of the locomotor cycle was studied in further detail in 11 cats. Figure 6A illustrates an example of locomotor entrainment. Each train occurs at the same time during the step cycle in the ipsilateral hindlimb, though there may be a slight variation in the step cycle of the contralateral hindlimb. The entrainment obtained in this cat was possible at 0.7, 0.8 and 1 train/s for a treadmill speed of 0.2 m/s (Figure 6B). Outside of this range of frequency and with the same treadmill speed, bilateral locomotion was no longer evoked, though contralateral locomotion could still be induced. In Figure 6C, the locomotor rhythm triggered by perineal stimulation and ISMS at a treadmill speed of 0.2 m/s is given. With

perineal stimulation, bilateral locomotion was induced at a rate of 0.75 cycle/s. In the subsequent EMG averages, the rhythm frequency could be evoked by stimulating at rates of 0.8 and 1 train/s (Fig. 6D and 6E), while the treadmill remained at the same speed (0,2 m/s). Ipsilateral extensor muscles and contralateral flexor and extensor muscles exhibited shorter bursts with increased frequencies. In 7 out of the 11 cats in which it was assessed, a clear entrainment by the stimulation (where the locomotor rhythm was identical to or had a difference of less than 0,01 cycle/s with the stimulation rate) was observed for train rates of 0,65 to 1 train/s.

### **Non-entrained locomotion**

Both tonic and train stimulation could evoke locomotion that could be temporarily sustained after the offset of the stimulation. Indeed, in Fig. 7A, trains of pulses evoke bilateral locomotion that persists for 3 more cycles after the stimulation has stopped. The cycle duration progressively increases and the locomotion eventually fades out. Thus, stimulation would activate a locomotor network but continuous stimulation is necessary to maintain the locomotor activity or to reset it. In the example shown in Fig. 7B, the oscillation of an independent and intrinsic locomotor network over the rhythmic bursts induced by the stimulation is clear. Indeed, at the beginning of this sequence on the left side (shaded area), an independent extensor burst in LVL and LGL was observed just before the stimulation induces another EMG burst in those muscles. Towards the middle of this sequence, the independent extensor burst is in synchrony with the stimulation. At the end, the extensor bursts emerges right after the activity triggered by the stimulation (second shaded area). This phenomenon is also observed for Srt muscle.

### **Short latency responses**

Based on the previous section, the ensemble of both tonic and phasic stimulation could activate pathways that induce locomotion. However, each pulse or train also induced short latency-short duration responses. In tonic stimulation, those responses consist of excitation that are integrated in EMG burst and are sometimes followed by a short period of inhibition during locomotion. Those responses can be observed as sudden jerky movements of small amplitude in the leg and is mainly observed in the ipsilateral limb.

Short latency responses during locomotion with train stimulation were also mostly visible in the EMG activity of the ipsilateral muscles. In figure 6A, while EMG of ipsilateral muscles exhibits a short latency burst with each train, the EMG traces of the contralateral hindlimb muscles do not exhibit a burst due to the stimulation, and the locomotor movements are more fluent. Ipsilaterally, the train is always synchronised with the end of the extensor muscles and the beginning of the flexor burst (St) or it induces an extra burst in the flexor muscle that is followed by a spontaneous discharge (TA). Also, a small inhibition in the contralateral flexor (St) is occurring when the stimulation train is applied, which is more evident towards the end of that sequence. Thus the effects of each train on the EMG burst were studied in more depth, depending on its occurrence in the locomotor cycle. Since stimulation had less direct impact on the contralateral hindlimb, the locomotor cycle was divided in 10 bins synchronised on the onset of EMG burst of the contralateral St. Those bins were then separated in 2 phases which corresponds to the contralateral flexor phase and contralateral extensor phase. The first 5 bins correspond to the main discharge of the contralateral St burst and the last 5 bins correspond to the quick offset of the contralateral St burst as well as the onset and the main discharge of extensor burst. In the 3 cats analyzed, the majority of trains occurred just before or at the onset of the EMG burst of the contralateral St. In the cat shown in Fig 8A, 74% of trains occurred just before or at the beginning of contralateral flexor burst (bins 10, 1, 2, 3). To determine the effects of those bursts was complex because stimulation at the intensity used activates all afferences, without differences. However, the main effects on the ipsilateral hindlimb seems to be a short latency excitation of all muscles and followed occasionally, by inhibition of extensor muscles. The main effect on the contralateral hindlimb is inhibition of flexor or extensor muscles.

An analysis per segment shows that this trend mainly applies to L6 and L7 segments. Indeed in Figure 8, effect of the stimulation trains were analyzed for a stimulation at L3 (Fig 8B-C) and at L7 (Fig 8D-E). Stimulation at L7 would indeed induce an inhibition in the contralateral VL, when applied during its burst of activity (Fig. 8D and E). When the stimulation train occurred earlier in the cycle (for example at bin 2), the train did not have a particular effect on any muscles though occasionally it would slightly inhibit contralateral flexion and induce a burst in the contralateral extensor muscles.



Stimulation at L3 mainly induced an inhibition in the contralateral flexor muscles as well as in the ipsilateral extensor muscles (Fig. 8B and C). These trends were confirmed in two other cats. It thus seems that when the stimulation is applied rostrally (L3), stimulus trains seem to inhibit contralateral flexor muscles. Inversely, when it is applied more caudally (L7) their effect is to inhibit contralateral extensor muscles.

### **Dorsal root stimulation**

#### **Responses evoked**

Dorsal root stimulation was tested in 3 cats from L3 to S2 and could trigger similar ipsilateral, bilateral and locomotor responses to those seen with ISMS (Barthelemy et al, submitted). The majority of responses induced by dorsal root stimulation consisted in ipsilateral flexion and bilateral flexion which was induced by the stimulation of each dorsal root tested (19% and 14% respectively). Ipsilateral extension was induced in caudal segments (5%), but the main responses however were locomotor responses. 40% of all responses obtained by dorsal root stimulation were contralateral locomotor activity. Ipsilaterally, it was accompanied by flexion (31%) from all dorsal roots or ipsilateral extension (7%) from caudal segments L6 to S2. In 2% of the cases it was accompanied by ipsilateral flexion followed by extension. Bilateral locomotion was evoked in 12 % of the cases. The occurrence of responses varied with the intensity used. Indeed, dorsal root stimulation would evoke flexion or extension of the ipsilateral hindlimb at visual motor threshold. Increasing the intensity would generate movement in the contralateral hindlimb, leading to bilateral flexion, bilateral extension or ipsilateral flexion with contralateral extension. Further increase of the intensity would induce locomotor responses. Locomotion of the contralateral hindlimb was the most frequent response induced and increasing or decreasing the intensity would, sometimes, trigger bilateral locomotion. Increasing or decreasing too much the intensity would stop bilateral locomotion and induce a strong ipsilateral movement with or without contralateral locomotion. Such an evolution of the responses triggered with variation of the intensity was observed at all roots.

Figure 9 displays the responses evoked by ISMS and dorsal root stimulation at L7 in the same cat. In the first column, electrical stimulation was applied slightly to the

right of the midline along the dorsoventral axis. Stimulation at the dorsal surface induced bilateral

locomotion. Indeed alternation is observed between St and VL/GL in both limbs. Descending the electrode to 2.5 mm deep induced ipsilateral extension (RVL and RGL) and contralateral flexion. At 3 mm below the dorsal surface, contralateral locomotion in the left hindlimb is induced and extension in the ipsilateral hindlimb is evoked. The small discharge observed in RSt was not large enough to induce a flexion movement. The last site stimulated in this track at 5.3 mm deep induced ipsilateral extension.

In the second column, stimulation of the right L7 dorsal root induced different responses depending on the intensity applied. In this cat, stimulation near the threshold induced bilateral locomotion. It also triggered short-latency responses that consist in a burst of activity occurring in all ipsilateral muscles (right side) and that is superimposed on the locomotor rhythm. At 15  $\mu$ A, only contralateral locomotion is observed and flexion in the ipsilateral hindlimb is evoked. There is still an activity in the ipsilateral extensor but it is barely noticeable and not large enough to induce an extension movement. At 30  $\mu$ A, ipsilateral extension with contralateral locomotion is evoked and at 40  $\mu$ A contralateral locomotion is still present, but accompanied by ipsilateral flexion. Thus increasing the intensity evokes a variety of responses that are similar to those evoked with ISMS. In contrast to what is observed in this example, higher intensities were usually more efficient to induce bilateral locomotion with dorsal root stimulation (see Figure 10).

### **Bilateral locomotion and optimal parameters**

#### **Electrical stimulation**

On the three cats where it was systematically tested, tonic (2 cats) and train (3cats) dorsal root stimulations were effective to induce sustained bilateral locomotor activity, while all 3 cats displayed contralateral locomotion with both tonic and train stimulation. Figure 10 shows the stick figure of the left hindlimb and EMG activity of bilateral locomotion induced by tonic stimulation applied unilaterally on the right dorsal root L4 of an untrained spinal cat. In A, the stick figure shows that flexion is mainly upward and forward during the swing phase, but that there is little movement of the hip. In B, the EMG activity shows clear alternation between flexor and extensor muscles in each

limb and between left and right hindlimbs, but the ipsilateral hindlimb sustained more perturbation due to the stimulation than the contralateral hindlimb. With tonic stimulation, each pulse induced short latency-short duration response, consisting of a short latency excitation followed by an inhibition. Those responses are more obvious in muscles of the ipsilateral than the contralateral limb and in the latter, in flexor muscles more than in extensor muscles. In the example shown in Fig. 10, responses are evoked in both ipsilateral and contralateral muscles but less in the contralateral extensor muscles (LVL and LGL).

Low frequency stimulation (1-6 Hz) was optimal to induce bilateral locomotion with dorsal root stimulation as was the case for intraspinal electrical stimulation. Stimulation above 6 Hz (up to 9 Hz) induced locomotion in the contralateral hindlimb only, the ipsilateral limb exhibiting flexion reflexes with each pulse. The stimulation frequency had an influence on the locomotor frequency of the locomotion induced. Increasing the frequency of the stimulation from 1 to 6 Hz, increased the locomotor frequency. Figure 11A compares tonic stimulation of L4 dorsal root given at the same intensity but at frequencies of 1 to 6 Hz in one spinal cat. Locomotion was achieved with all frequencies and the curve indicates that locomotor frequency was a function of stimulus frequency. A significant increase of locomotor frequency was found between the slower frequencies (1,2 and 3 Hz; mean=0.98cycle/s) and the faster frequencies (4,5,6 Hz; mean=1.28cycle/s;  $p<0,001$ ).

The frequency of trains also had an effect on locomotor frequency and an entrainment was obtained in 2 cats out of the three tested. Optimal parameters to induce bilateral locomotion with train stimulation were the same as with ISMS, with a intra-train frequency of 50 Hz, a train duration between 100 and 200 ms and an inter-train duration of 0.8 to 1 train/s.

### **Effect of intensity**

The efficient intensities to induce locomotion could go as high as 300  $\mu$ A for dorsal root stimulation, which is a larger range than for ISMS. We could thus assess the influence of intensity on cycle duration. Indeed in Fig 11B, intense bilateral locomotion could be induced by train stimulation at intensity of 150  $\mu$ A. When the amplitude is diminished to 60 $\mu$ A, the cycle duration gradually increases (going from 625 ms to 1250

ms) and the locomotor rhythm slows down. However after about 10 seconds, only contralateral locomotion is induced at that intensity (rightmost part of the sequence).

### **Induction of locomotion**

The majority of locomotion sequences evoked by dorsal root stimulation followed the same two patterns described for ISMS, but the alternation between flexor and extensor muscles in both hindlimbs simultaneously was mainly observed. It is interesting to note that in the majority of sequences, EMG bursts first appear in ipsilateral flexor muscles and contralateral extensor muscles simultaneously.

### **Lesions**

#### ***Intraspinal microinjections of Yohimbine***

Intraspinal injections of yohimbine restricted to both L3 and L4 segments or only to the L4 segment abolished locomotion that could previously be evoked by electrical stimulation of segments L5 to S1 (see Table 3). The locomotor pattern could later be reinstated after injection of clonidine intraspinally (i.s.) and intravenously (i.v.). An example is shown in Figure 12A, which illustrates the locomotion evoked by stimulation of the L6 segment in an untrained spinal cat with clonidine i.v. The EMG averages clearly show an alternation between flexor (St) and extensor muscles (VL, GL) in both hindlimbs. Ten minutes after microinjection of yohimbine at L3 and L4 (Figure 12B), locomotion can no longer be elicited by perineal stimulation or electrical stimulation. Instead, a flexion of all the joints of the ipsilateral hindlimb is evoked by each train of pulses and EMG of both hindlimb muscles synchronously discharge with the stimulation. In Figure 12C, 2 hours after injecting clonidine i.s. in L3 and L4 at first and then i.v., locomotor rhythm with perineal stimulation and ISMS were reinstated in the same cat. Indeed, the alternation between flexor (St) and extensor (VL and GL) bursts is observed.

### **Spinal lesions**

Progressive spinal cord lesions were made at different locations of segments L2, L3, L4 and L5 (see Table 3) and electrical stimulation was applied caudal to these lesions. In the 1 week spinal cat shown in Figure 13, stimulation at caudal L6 could induce bilateral locomotion. After a lesion at the junction of L2 and L3, intraspinal stimulation at caudal L6

level could still induce locomotion. Thus segment L2 is not crucial to induce locomotion by electrical stimulation of more caudal segments. However, analysis of EMG activity after the lesion shows an increase in the burst of bilateral flexor muscles following this lesion (arrows in Figure 13). Also, extensor bursts were decreased in the ipsilateral hindlimb (LVL).

In the two one-week untrained spinal cats tested, a complete section at the junction of the segments L3 and L4 abolished all locomotor responses that were observed prior to the lesion. However in the one trained spinal cat tested with this lesion, another lesion at L4 was necessary. In Figure 14A, electrical stimulation at mid L6 triggers a bilateral locomotor pattern in a trained spinal cat (T13) with clonidine. The alternation between St and VL/GL should especially be noticed. A complete section at the L3-L4 junction abolishes all locomotor rhythm elicited by stimulation of mid L6 segment, as was the case in the one-week untrained spinal cats. However, electrical stimulation at higher intensity (90  $\mu$ A instead of 40  $\mu$ A) applied at segment L7 in the same cat evokes a bilateral locomotor rhythm, 30 minutes after the acute spinalization at L3-L4, but the EMG amplitude of extensor muscles were diminished (LVL and LGL) or abolished. (Figure 14B). The locomotor pattern is still triggered by electrical stimulation of L7 segment after a dorsal hemisection at mid L4 (Figure 14 C), though a higher intensity is required (200  $\mu$ A). In the 8 cats tested, dorsal hemisection made at L3 or L4 never stopped locomotion from being evoked by electrical stimulation of more caudal or rostral segments. In Figure 14D, locomotion was abolished after a complete section at mid-L4. Indeed, no alternation between flexor and extensor muscles are evoked although short-latency EMG bursts are evoked synchronously in both hindlimbs with each train. Electrical stimulation of more caudal levels or at higher intensities up to two hours after this third spinal section did not evoke any locomotion. Similar results were also obtained using stimulation of dorsal roots caudal to the lesion.

To test if a ventrodorsal lesion would induce the same behavioural progression, we performed a section of the ventral and ventrolateral funiculi at caudal L4. In one of those cats, a bilateral rhizotomy was done at segments L3-L4, prior to the ventral lesion. A reconstruction of the lesion based on histological slides is shown in Fig 15. Intraspinal electrical stimulation at L5 as well as stimulation of dorsal root L7 could induce bilateral

locomotion after the bilateral rhizotomy at L3-L4, alternation being observed in both limbs. However, after the ventral hemisection, bilateral locomotion could no longer be induced with perineal stimulation, intraspinal electrical stimulation or dorsal root stimulation, even at the highest intensity used. Short latency responses were still present, however as dorsal root stimulation could evoke ipsilateral extension and intraspinal stimulation induced bilateral extension.

## Discussion

The results of this study clearly show that electrical stimulation applied in the lumbar cord or on one dorsal root of cats spinalised at T13 and that have received clonidine i.v. can elicit bilateral and alternate locomotor movements of the hindlimbs. Characteristics of locomotion evoked by both means are similar, which suggest that they share the same synaptic pathways to induce bilateral locomotion. Furthermore, locomotion induced by segments L5 to S1 was blocked when the mid-lumbar segments L3-L4 were either inactivated by restricted intraspinal injections of yohimbine or disconnected surgically from lower lumbar segments. Taken together, these results strongly suggest that although dorsal pathways and dorsal roots may be used by the stimulation to induce bilateral locomotion, but the ventral pathways connecting midlumbar segments and more caudal segments are critical to evoke locomotion by electrical stimulation.

### Optimal parameters of the stimulation

Using a single electrode, we found that tonic stimulation at 2-6 Hz and trains of pulses at 0.65 to 1 train/s were the most efficient to trigger bilateral locomotion in spinal cats. We used relatively low intensities of electrical stimulation (20-90  $\mu$ A) for ISMS but required more current for stimulation of dorsal roots through bipolar hook electrodes. We used both tonic and train of stimulation paradigms. Although tonic stimulation was the least interfering with locomotion, trains of stimulation could also entrain locomotion of the hindlimbs, a desirable feature for future use in a neuroprosthetic context.

### Characteristics of the locomotion evoked

The locomotion induced by ISMS resembled that evoked by perineal stimulation, but the coupling between the limbs or between flexor and extensor muscles of a single limb had more variation. Furthermore, though training had a positive effect on regularity of cycles during a locomotion sequence, the interindividual differences between cats seemed to account for most of the differences observed.

ISMS applied in rostral segments seemed to have a preponderant input on flexor muscles, while ISMS in more caudal segments would mainly affect extensor muscles. Indeed during bilateral locomotion, the hindlimb ipsilateral to the stimulation would touch the treadmill further in front of the hip when the stimulation was applied in rostral segments. This could be explained in part by the localization of hip flexor motoneurons in rostral segment (Vanderhorst and Hostege, 1991). Their activation would allow a more anterior flexion of the hip, which could bring the foot forward. Alternatively, the ipsilateral hindlimb would start the swing phase when the toe was further behind the hip when the stimulation was applied caudally. This might be explained by activation of gluteal and proximal muscles of the hip which are mainly located in L6, L7 and S1 (Vanderhorst and Holstege, 1997). However, we did not record from those muscles.

Another evidence that rostral segment might have a preponderant activation on flexor-related neurons and caudal segment, on extensor-related neurons, are the short-latency responses induced by each stimulation train in the contralateral hindlimb. Trains applied in rostral segments will more likely inhibit the contralateral flexor muscles when it is active, while trains applied in caudal segments will more likely inhibit the contralateral extensor muscles when it is active. In the ipsilateral hindlimb, the trains will generally activate both flexor and extensor muscles. However, this is not a rule and stimulation trains could inhibit muscles ipsilaterally. For example, stimulation at L3 would inhibit extensor muscles ipsilaterally and flexor muscles contralaterally (see Figure 8). It can thus be hypothesized that the stimulation in rostral segments would promote ipsilateral flexion and would inhibit ipsilateral extension if it is ongoing. Furthermore, during locomotion, while one hindlimb is in flexion, the other hindlimb is in extension and both hindlimbs can not be in flexion at the same time. Thus, the stimulation would inhibit contralateral flexor muscles to allow ipsilateral flexor muscles to discharge. Likewise, the stimulation in more caudal segments might inhibit contralateral extension because it is stimulating elements that would promote ipsilateral extension. No such effect was observed with tonic stimulation as each pulse evoked a short latency-short lasting excitation often followed by a short-lasting inhibition. With dorsal root stimulation, those reflexes were more present in the ipsilateral hindlimb and were the least perturbing in the extensor muscles of the contralateral hindlimb. That was observed in the roots of all segments tested.



By varying the frequency of the stimulation, we could influence the cycle duration of the locomotion and, using trains of pulses we could reset the locomotion and entrain it within a certain bracket of frequencies on numerous occasions. This observation suggests that elements activated by electrical stimulation share pathways common with rhythm generators (Conway et al., 1987; Pearson et al., 1992c; Schomburg et al., 1998; Gossard et al., 1994). The pulse amplitude also influences the locomotor frequency, but to a narrower extent since very low or very high amplitude would prevent locomotion from being induced.

Though the stimulation can entrain the locomotion, each train does not induce a step. It is the ensemble of trains that evoke locomotion by activating a self-sustained locomotor network. This is suggested by efficient tonic stimulation, where one pulse do not evoke a step, and by sequences of locomotion where our stimulation could not match the intrinsic oscillation rhythm of the neuronal network. The timing of spontaneous burst would then shift with time and with respect to the stimulation train (see Figure 6). The activation of a neuronal network could also be infer by the presence of the locomotion post-stimulation, where bilateral locomotion persisted for a few cycles after the offset of the stimulation. The continuous stimulation would then be necessary to maintain the locomotor activity.

Altogether, these characteristics of locomotion are similar to those described by Shapkova and Schomburg (2001) in humans. Indeed, they observed bilateral and alternating flexor-extensor activity independent from the stimulus frequency, which they called ‘locomotor stepping’, that would continue after the offset of the stimulation. They also observed a second type of stepping, referred to as ‘reflexogenic stepping’, which was largely coupled to the stimulus frequency and ended with the stimulation. Both types of locomotion would reflect the involvement of a spinal locomotor generator and they were both evoked in this study.

Though, trained cats exhibited a slightly more regular locomotor pattern than untrained cats (less variation in the interlimb and intralimb coupling), the effect of training on the locomotion induced was not as high as expected. Other studies have shown an improvement in the synaptic transmission of different pathways (notably Ib and cutaneous) in cats that were trained between 3 to 5 weeks (Cote and Gossard, 2004; Cote et al., 2003)

We trained the cats until they recovered locomotion for a similar period (3-5 weeks), but the changes observed were not conclusive. With a longer period of entrainment on the treadmill, we might observe larger changes.

### **Electrical stimulation as a mean to trigger locomotion**

The use of electrical stimulation to induce locomotion has been demonstrated before. With epidural stimulation, Iwahara and al. (1991) elicited locomotion in acute spinal cats (T7). This was also observed with stimulation of the dorsal funiculi of spinal (Grillner and Zangger, 1979; Gerasimenko and Lavrov, 2001) and decerebrated cats (Gerasimenko and Lavrov, 2001), as well as epidural stimulation. Other studies using ISMS through one electrode were performed in the cat and in two studies, whole limb movements in the ipsilateral or contralateral hindlimb were observed (Tai et al., 2003; Lemay and Grill, 2004) and the authors suggested that the combination of a few electrodes could induce more complex hindlimb movements, notably locomotion. Other studies showed that stimulating through multiple electrodes located in the ventral horn could induce weight-bearing bilateral locomotion in an open loop and closed loop control paradigm. Cats spinalised 2 to 4 weeks prior to the experiment would show regular stepping with little fatigue (Saigal et al., 2004).

In our preceding paper (Barthélemy et al, submitted), stimulation through one electrode was shown to evoke bilateral locomotion when applied dorsally, which suggested that afferents or postsynaptic elements contacted by afferents were activated. This was confirmed by data presented in this study. Indeed in the same preparation, responses evoked by ISMS could also be induced by dorsal root stimulation and the characteristics of locomotion evoked by both means were similar. Other studies demonstrated the efficiency of dorsal root stimulation. In an earlier report, dorsal root stimulation could induce bilateral locomotion on a moving treadmill in decerebrate cats and in acute spinal cats with L-Dopa (Budakova, 1971). Grillner and Zangger (1979) also evoked bilateral fictive locomotion in a spinal cat with Dopa and Marchetti et al (2001) obtained similar results in the in vitro neonatal rat preparation when stimulating a single dorsal root. In the later study, it was reported that the period of locomotion was independent of stimulation frequency (1-10Hz) and only moderately dependant on stimulus intensity. However, here we show that there

can be an influence of both the intensity and the frequency of the stimulation on the frequency of locomotion, at the same treadmill speed.

Both dorsal root and ISMS evoked bilateral stepping often with a smoother movement in the contralateral hindlimb. This difference might be caused in part by the stimulation which not only induces locomotion through propriospinal pathways, but also induce short-latency reflexes via segmental networks located mainly ipsilaterally. The occurrence of those reflexes would perturb locomotion on the ipsilateral hindlimb and could also prevent locomotion from being expressed ipsilaterally. In the latter case, contralateral locomotion might be an incomplete expression of bilateral locomotion. However, the emergence of contralateral locomotion could also be due to the use of clonidine that may reveal different pathways in the spinal cord and would allow the stimulation to have a preponderant influence on locomotor networks of the contralateral side. Recent evidence suggests that unilateral rhythmic activity is possible in the absence of the contralateral hemicord (Cangiano and Grillner, 2003a; Cangiano and Grillner, 2005). Thus each hemicord is able to generate rhythmic bursting without contralateral inhibition. This could explain sequences of ipsilateral locomotion and also contralateral locomotion, granted that an input from the contralateral side is provided to start the rhythmic alternation. But through which pathways can that input be provided?

### **Components of locomotor network**

One response to this question might be in the observations made on the mechanisms of induction of locomotion. Locomotion sequence would often start by EMG activity in the contralateral extensor muscles and ipsilateral flexor muscles simultaneously. This activation is similar to the crossed extension reflex and the neuronal elements activating crossed extension reflex might be the starting pathway to induce contralateral and bilateral locomotion both by ISMS and by dorsal root stimulation.

Indeed, interneurons mediating crossed reflexes are included in polysynaptic pathways that may involve one or more interneurons (Harrison et al., 1986). A majority of those neurons reside in lamina VIII and their axons contact motoneurons of the contralateral side in segments L4 to S1 (Jankowska and Skoog, 1986; Harrison et al.,

1986). Those neurons are most densely found at the border of L3-L4 and L4-L5 segments, as well as within segments L6-L7. Those interneurons are activated by monosynaptic inputs from group I and group II afferents. Dorsal root stimulation or the dorsally located ISMS could be activating afferents to those interneurons to induce bilateral locomotion and contralateral locomotion.

Lamina VIII interneurons are also excited by other sensory fibers oligo- and polysynaptically, for example via group II interneurons. One subgroup of these interneurons are located in the midlumbar segments L3-L4-L5 (Edgley and Jankowska, 1987a; Edgley and Jankowska, 1987b; Lundberg et al., 1987b; Lundberg et al., 1987c; Lundberg et al., 1987a), while another concentration of group II interneurons are located in L6 and L7 segments (Riddell et Hadian, 2000). With their projections to lamina VIII interneurons and lumbosacral motoneurons, the involvement of group II interneurons might be important in the locomotion induced.

However, the main polysynaptic input to lamina VIII interneurons is via shared FRA pathways. Interneurons subserving flexion-extension reflexes (FRA pathways and interneurons) are a probable target of electrical stimulation because of the intensities used. Indeed, though the intensity used was relatively low, it was more than 4 or 5 times motor threshold, thus the stimulation would not be selective for a particular afferent, and would activate lower threshold afferents (group I) as well as higher threshold afferents of muscle, skin and joint (group II, III). FRA interneurons coordinate activity of motoneurons of both the ipsi and contralateral hindlimbs and could thus be central to the induction of bilateral locomotion. This is further supported by the use of clonidine, a noradrenergic agonist, in this study. Indeed, in acute spinal cats injected with L-DOPA single trains to the FRAs could evoke brief periods of alternating activity in flexor and extensor nerves (Jankowska et al., 1967a; Jankowska et al., 1967b; Lundberg, 1979). These alternating bursts of activity were believed to be the basis for locomotion and it was proposed that the pathways mediating the FRA responses involved the same neuronal networks as the rhythm generator of locomotion (Lundberg, 1979; Gossard and Hultborn, 1991). Though the involvement of the above-mentioned interneuronal pathways might be more preponderant, other described propriospinal pathways are also involved, such as pathways linking middle lumbar

segments with lower lumbar and sacral segments that have been described by Kostyuk et al. (1971).

The present results reveal that bilateral locomotion can be evoked by low intensity intraspinal electrical stimulation applied dorsally in the spinal cord through a single electrode or on a unilateral dorsal root. The stimulation will then activate propriospinal pathways that would in turn activate the locomotor pattern generator of the lumbosacral cord. This parallels previous findings of this laboratory where intraspinal injection of clonidine restricted to one segment was enough to induce bilateral locomotion in a one week spinal cat (Marcoux and Rossignol, 1998).

### **Importance of rostral segments**

Our results suggest that segments L3-L4 which are rostral to segments containing the main motoneuronal pools of the hindlimb (Vanderhorst and Holstege, 1997) seem to play a crucial role for the activation of locomotion in spinal cats. Using other approaches, similar conclusions have been reached in other species. In the neonatal rat, restricted pharmacological stimulation of rostral segments L1-L2 (corresponding to L3-L4 in the cat) were suggested to play a leading role in the generation of the locomotor pattern (Kjaerulff and Kiehn, 1996); (Cazalets and Bertrand, 2000). In spinal rats that received a graft of 5-HT mesencephalic embryonic cells, (Gimenez y Ribotta et al., 2000) reported a recovery of locomotion only in rats in which the rostral L1-L2 levels were reinnervated by serotonergic fibers. The importance of rostral segments were also observed in the turtle (Mortin and Stein, 1989) and the mudpuppy (Wheatley et al., 1994). Even in spinal cord injured patients, epidural stimulation of the dorsal surface of spinal segments L2 was shown to be optimal to induce locomotor movements of the legs (Gerasimenko Y.P. et al., 2002). In the cat, previous studies done in this laboratory have also demonstrated the importance of more rostral segments (Leblond et al., 2001; Marcoux and Rossignol, 2000). (Deliagina et al., 1983) showed that although rhythmic abilities are distributed throughout the lumbar spinal cord, segment L4 was essential for the expression of scratching. (Grillner and Zangger, 1979) showed, in a paralyzed spinal cat injected with L-Dopa (fictive locomotion preparation) that alternating activity between TA and GL nerves could be observed after an acute spinal transection at L5 suggesting a distributed potential for

rhythmogenesis at lower spinal levels being revealed by DOPA. Similarly, in behaving chronic spinal cats (T13), although a second lesion at L4 abolished locomotion despite weeks of attempt at locomotor training (Langlet et al., 2005), alternating rhythmic activity typical of fast paw shake could still be observed. This suggests that although there is a rhythmogenic potential throughout the lumbo-sacral cord, the integrity of segments L3-L4 is needed for a full hindlimb locomotion on the treadmill. What might be the neuronal components underlying these observations?

### **Neuronal elements in mid-lumbar segments of the cat**

Propriospinal neurons located in the pre-enlargement segment L3, L4 and rostral L5 receive signals from the supraspinal system as well as peripheral afferents and relay those inputs to more caudal segments in the cat (Kostyuk et al., 1971). Hence it is possible that the integration of both inputs for locomotion takes place at that level. In the cat, a population of mid-lumbar interneurons located in L3-L4 segments receive peripheral inputs mainly from group II afferents of quadriceps and sartorius and project mainly in the ventrolateral funiculus to make contact with motoneurons in L4 to S1 (Edgley and Jankowska, 1987a; Edgley and Jankowska, 1987b; Lundberg et al., 1987b; Lundberg et al., 1987c; Lundberg et al., 1987a). Furthermore, those interneurons located in L4 were shown to be active during MLR-evoked fictive locomotion in decerebrate cats (Shefchyk et al., 1990). Also, a group of commissural interneurons located in lamina VIII of mid-lumbar segments L3-L5 receive input from reticulo and/or vestibulospinal neurons and were shown to influence the activity of contralateral muscles (Krutki et al., 2003). Based on their rostral location and on their ventral projections, these groups of interneurons might be central in the initiation of locomotion by electrical stimulation. The stimulation of caudal segments might activate those mid-lumbar neurons by antidromic activation of their axons or by activation of ascending propriospinal pathways, such as axons sent by another class of group II interneurons located in L6-L7 segments (Riddell et Hadian, 2000). Almost half of these interneurons project ipsilaterally within the lateral funiculus to the L4 segment, while some of them contact motoneurons directly. In the present study, ventral and ventrolateral pathways were found to be crucial to elicit locomotion by intraspinal stimulation of the dorsal regions and, based on the pathways used by the propriospinal neurons described

above, the section of ventral quadrants might not only prevent the output of the mid-lumbar interneurons, but also their activation.

### **Implication in rehabilitation**

This also might have implication for artificial control of locomotion in humans. Already electrical epidural stimulation in spinal cord injured patients (Struijk et al., 1993; Minassian et al., 2004; Dimitrijevic et al., 1998; Shapkova and Schomburg, 2001) show promising results and an approach similar to the one used here, with a combination of pharmacological and electrical stimulation, might be adaptable for patients. Intraspinal stimulation could induce locomotion (either intraspinally or by dorsal root stimulation). Indeed a small number of electrodes could be implanted chronically, each one being able to produce the whole locomotor synergy. The intensity used to ensure locomotion was relatively low which will minimise the harm cause to the tissue. Either tonic or train stimulation was used and showed to be successful. However, tonic stimulation causes less disruption of the locomotor cycle. This was expected, but the possible benefits from train stimulation are not to be overlooked. Indeed, with a signal from the forelimb EMG (or from another supraspinal source) for example, hindlimb locomotion evoked by ISMS or dorsal root stimulation could be entrained at the desired frequency. Thus combination of locomotor training (Barbeau and Rossignol, 1987), pharmacology (Chau et al., 1998a) and electrical stimulation (ISMS or dorsal root) might be beneficial to enhance the spinal capacity to express the inherent spinal locomotor circuitry.

## Acknowledgements

The authors wish to express their sincere appreciation to J. Provencher for the technical assistance during surgery, experiments, analyses and preparation of the illustrations. We also thank P. Drapeau for programming, C. Gagner for electronics, C. Gauthier for illustrations, F. Gauthier for help during surgery and J. Lavoie for histological assistance. This work was supported by an individual and a group grant from CIHR and also from a Tier 1 Canada Chair on spinal cord research to S.R (part support for H.L). D.B. received a studentship from FRSQ/FCAR Santé and the Groupe de recherche en sciences neurologiques. H.L.was also partly supported by a grant from the Quebec Mental Health and Neuroscience Network of the FRSQ.



## Bibliography

Barbeau H, Rossignol S (1987) Recovery of locomotion after chronic spinalization in the adult cat. *Brain Res* 412: 84-95.

Barbeau H, Rossignol S (1991) Initiation and modulation of the locomotor pattern in the adult chronic spinal cat by noradrenergic, serotonergic and dopaminergic drugs. *Brain Res* 546: 250-260.

Barthélemy, D., Leblond H., Provencher, J., and Rossignol, S (2005) Hindlimb motor patterns evoked by intraspinal or dorsal root stimulation at the same segment in spinal cats. *Soc. Neurosci Abstr.* 35.

Barthélemy, D., Leblond, H., and Rossignol, S (2002) Electrical stimulation of the lumbar spinal cord and the importance of mid lumbar segments in eliciting spinal locomotion. *Society for Neuroscience Abstracts* 28[65.19].

Budakova NN (1971) Stepping movements evoked in a mesencephalic cat by a rhythmic stimulation of a dorsal root in mesencephalic cat. *Sechenov Physiol J of USSR* 57: 1632-1640.

Cangiano L, Grillner S (2003) Fast and slow locomotor burst generation in the hemispinal cord of the lamprey. *J Neurophysiol* 89: 2931-2942.

Cangiano L, Grillner S (2005) Mechanisms of rhythm generation in a spinal locomotor network deprived of crossed connections: the lamprey hemicord. *J Neurosci* 25: 923-935.

Cazalets JR, Bertrand S (2000) Coupling between lumbar and sacral motor networks in the neonatal rat spinal cord. *Eur J Neurosci* 12: 2993-3002.

Chau C, Barbeau H, Rossignol S (1998) Early locomotor training with clonidine in spinal cats. *J Neurophysiol* 79: 392-409.

Conway BA, Hultborn H, Kiehn O (1987) Proprioceptive input resets central locomotor rhythm in the spinal cat. *Exp Brain Res* 68: 643-656.

Cote MP, Gossard JP (2004) Step training-dependent plasticity in spinal cutaneous pathways. *J Neurosci* 24: 11317-11327.

Cote MP, Menard A, Gossard JP (2003) Spinal cats on the treadmill: changes in load pathways. *J Neurosci* 23: 2789-2796.

Cowley KC, Schmidt BJ (1997) Regional distribution of the locomotor pattern-generating network in the neonatal rat spinal cord. *J Neurophysiol* 77: 247-259.

Deliagina TG, Orlovsky GN, Pavlova GA (1983) The capacity for generation of rhythmic oscillations is distributed in the lumbosacral spinal cord of the cat. *Exp Brain Res* 53: 81-90.

Dimitrijevic MR, Gerasimenko Y, Pinter MM (1998) Evidence for a spinal central pattern generator in humans. *Ann N Y Acad Sci* 860: 360-376.

Edgley SA, Jankowska E (1987a) An interneuronal relay for group I and II muscle afferents in the midlumbar segments of the cat spinal cord. *J Physiol* 389: 647-674.

Edgley SA, Jankowska E (1987b) Field potentials generated by group II muscle afferents in the middle lumbar segments of the cat spinal cord. *J Physiol* 385: 393-413.

Forssberg H, Grillner S (1973) The locomotion of the acute spinal cat injected with clonidine i.v. *Brain Res* 50: 184-186.

Gerasimenko Y.P., Makarovskii AN, Nikitin OA (2002) Control of locomotor activity in humans and animals in the absence of supraspinal influences. *Neuroscience and Behavioral Physiology* 32: 417-423.

Gerasimenko, Y. and Lavrov, I (2001) Neurophysiology of mammalian spinal locomotion. World Congress on Neuroinformatics Vienna 2001 , 53.

Gerasimenko YP, Avelev VD, Nikitin OA, Lavrov IA (2003) Initiation of locomotor activity in spinal cats by epidural stimulation of the spinal cord. *Neurosci Behav Physiol* 33: 247-254.

Gerasimenko YP, Lavrov IA, Bogacheva IN, Shcherbakova NA, Kucher VI, Musienko PE (2005) Formation of locomotor patterns in decerebrate cats in conditions of epidural stimulation of the spinal cord. *Neurosci Behav Physiol* 35: 291-298.

Gimenez y Ribotta M, Provencher J, Feraboli-Lohnherr D, Rossignol S, Privat A, Orsal D (2000) Activation of locomotion in adult chronic spinal rats is achieved by transplantation of embryonic raphe cells reinnervating a precise lumbar level. *J Neurosci* 20: 5144-5152.

Gossard J-P, Brownstone RM, Barajon I, Hultborn H (1994) Transmission in a locomotor-related group Ib pathway from hindlimb extensor muscles in the cat. *Exp Brain Res* 98: 213-228.

Gossard J-P, Hultborn H (1991) The organization of the spinal rhythm generation in locomotion. In: *Restorative Neurology* (Wernig A, ed), pp 385-404. Elsevier.

Grillner S, Zangger P (1979) On the central generation of locomotion in the low spinal cat. *Exp Brain Res* 34: 241-261.

Harrison PJ, Jankowska E, Zytnicki D (1986) Laminae VIII interneurons interposed in crossed reflex pathways in the cat. *J Physiol* 371: 147-166.

Ichiyama RM, Gerasimenko YP, Zhong H, Roy RR, Edgerton VR (2005) Hindlimb stepping movements in complete spinal rats induced by epidural spinal cord stimulation. *Neurosci Lett*

Iwahara T, Atsuta Y, Garcia-Rill E, Skinner RD (1991) Spinal cord stimulation-induced locomotion in the adult cat. *Brain Res Bull* 28: 99-105.

Jankowska E, Jukes MGM, Lund S, Lundberg A (1967a) The effect of DOPA on the spinal cord. 5. Reciprocal organization of pathways transmitting excitatory action to alpha motoneurons of flexors and extensors. *Acta Physiol Scand* 70: 369-388.

Jankowska E, Jukes MGM, Lund S, Lundberg A (1967b) The effects of DOPA on the spinal cord. 6. Half centre organization of interneurons transmitting effects from the flexor reflex afferents. *Acta Physiol Scand* 70: 389-402.

Jankowska E, Skoog B (1986) Labelling of midlumbar neurones projecting to cat hindlimb motoneurons by transneuronal transport of a horseradish peroxidase conjugate. *Neurosci Lett* 71: 163-168.

Kjaerulff O, Kiehn O (1996) Distribution of networks generating and coordinating locomotor activity in the neonatal rat spinal cord *in vitro: a lesion study*. *J Neurosci* 16: 5777-5794.

Kostyuk PG, Vasilenko DA, Lang E (1971) Propriospinal pathways in the dorsolateral funiculus and their effects on lumbosacral motoneuronal pools. *Brain Res* 28: 233-249.

Krutki P, Jankowska E, Edgley SA (2003) Are crossed actions of reticulospinal and vestibulospinal neurons on feline motoneurons mediated by the same or separate commissural neurons? *J Neurosci* 23: 8041-8050.

Langlet C, Leblond H, Rossignol S (2005) The mid-lumbar segments are needed for the expression of locomotion in chronic spinal cats. *J Neurophysiol* 93: 2474-2488.

Leblond, H., Marcoux, J., and Rossignol, S (2001) The relative importance of midlumbar segments in real and fictive locomotion of spinal cats. *Society for Neuroscience Abstracts* 27[517.3].

Lemay MA, Grill WM (2004) Modularity of motor output evoked by intraspinal microstimulation in cats. *J Neurophysiol* 91: 502-514.

Lundberg A (1979) Multisensory control of spinal reflex pathways. In: Reflex control of posture and movement (Granit R, Pompeiano O, eds), pp 11-28. North-Holland: Elsevier.

Lundberg A, Malmgren K, Schomburg ED (1987a) Reflex pathways from group II muscle afferents 1. Distribution and linkage of reflex actions to  $\alpha$ -motoneurons. *Exp Brain Res* 65: 271-281.

Lundberg A, Malmgren K, Schomburg ED (1987b) Reflex pathways from group II muscle afferents. 2. Functional characteristics of reflex pathways to alpha- motoneurons. *Exp Brain Res* 65: 282-293.

Lundberg A, Malmgren K, Schomburg ED (1987c) Reflex pathways from group II muscle afferents. 3. Secondary spindle afferents and the FRA: a new hypothesis. *Exp Brain Res* 65: 294-306.

Magnuson DS, Trinder TC, Zhang YP, Burke D, Morassutti DJ, Shields CB (1999) Comparing deficits following excitotoxic and contusion injuries in the thoracic and lumbar spinal cord of the adult rat. *Exp Neurol* 156: 191-204.

Marchetti C, Beato M, Nistri A (2001) Alternating rhythmic activity induced by dorsal root stimulation in the neonatal rat spinal cord in vitro. *J Physiol* 530: 105-112.

Marcoux J, Rossignol S (2000) Initiating or blocking locomotion in spinal cats by applying noradrenergic drugs to restricted lumbar spinal segments. *J Neurosci* 20: 8577-8585.

Minassian K, Jilge B, Rattay F, Pinter MM, Binder H, Gerstenbrand F, Dimitrijevic MR (2004) Stepping-like movements in humans with complete spinal cord injury induced by epidural stimulation of the lumbar cord: electromyographic study of compound muscle action potentials. *Spinal Cord* 42: 401-416.

Mortin LI, Stein PSG (1989) Spinal cord segments containing key elements of the central pattern generators for three forms of scratch reflex in the turtle. *J Neurosci* 9: 2285-2296.

Pearson KG, Jiang W, Ramirez JM (1992a) The use of naloxone to facilitate the generation of the locomotor rhythm in spinal cats. *J Neurosci Methods* 42: 75-81.

Pearson KG, Ramirez JM, Jiang W (1992b) Entrainment of the locomotor rhythm by group Ib afferents from ankle extensor muscles in spinal cats. *Exp Brain Res* 90: 557-566.

Riddell J.S, Hadian M (2000) Interneurones in pathways from group II muscle afferents in the lower-lumbar segments of the feline spinal cord. *J Physiol* 522.1: 109-123.

Saigal R, Renzi C, Mushahwar VK (2004) Intraspinal microstimulation generates functional movements after spinal-cord injury. *IEEE Trans Neural Syst Rehabil Eng* 12: 430-440.

Schomburg ED, Petersen N, Barajon I, Hultborn H (1998) Flexor reflex afferents reset the step cycle during fictive locomotion in the cat. *Exp Brain Res* 122: 339-350.

Shapkova EY, Schomburg ED (2001) Two types of motor modulation underlying human stepping evoked by spinal cord electrical stimulation (SCES). *Acta Physiol Pharmacol Bulg* 26: 155-157.

Shefchyk S, McCrea DA, Kriellaars D, Fortier P, Jordan L (1990) Activity of interneurons within the L4 spinal segment of the cat during brainstem-evoked fictive locomotion. *Exp Brain Res* 80: 290-295.

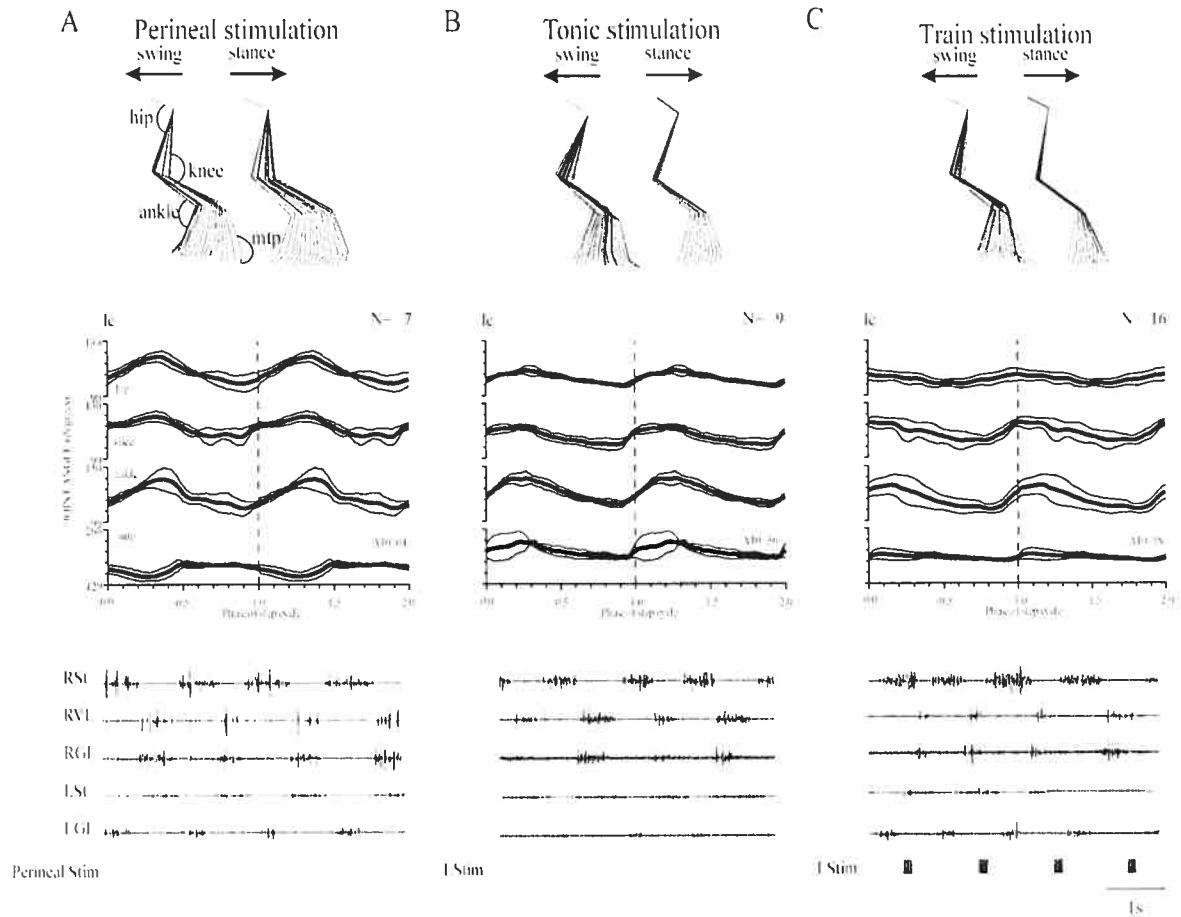
Struijk JJ, Holsheimer J, Boom HB (1993) Excitation of dorsal root fibers in spinal cord stimulation: a theoretical study. *IEEE Trans Biomed Eng* 40: 632-639.

Tai C, Booth AM, Robinson CJ, de Groat WC, Roppolo JR (2003) Multi-joint movement of the cat hindlimb evoked by microstimulation of the lumbosacral spinal cord. *Exp Neurol* 183: 620-627.

Vanderhorst VGJM, Holstege G (1997) Organization of lumbosacral motoneuronal cell groups innervating hindlimb, pelvic floor, and axial muscles in the cat. *J Comp Neurol* 382: 46-76.

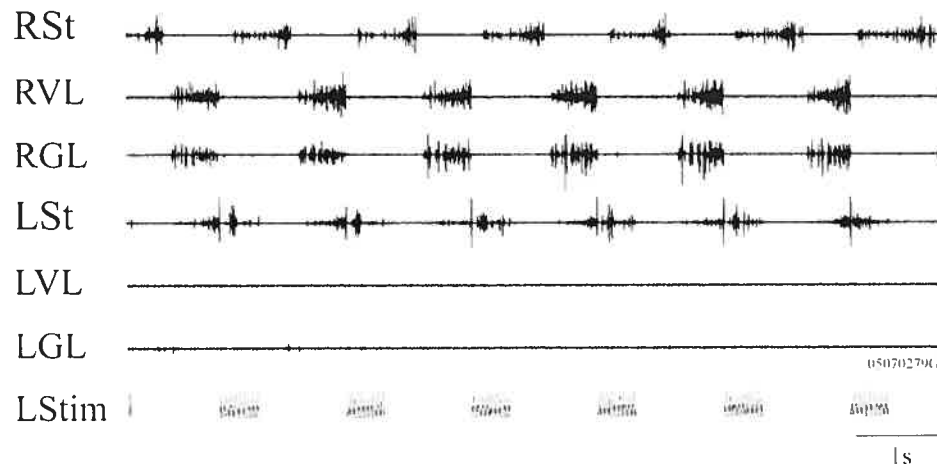
Wheatley M, Jovanovic K, Stein RB, Lawson V (1994) The activity of interneurons during locomotion in the in vitro necturus spinal cord. *J Neurophysiol* 71: 2025-2032.

## Figures



**Article2-Figure 1-Locomotion induced by perineal and electrical stimulation in an untrained spinal cat with clonidine**

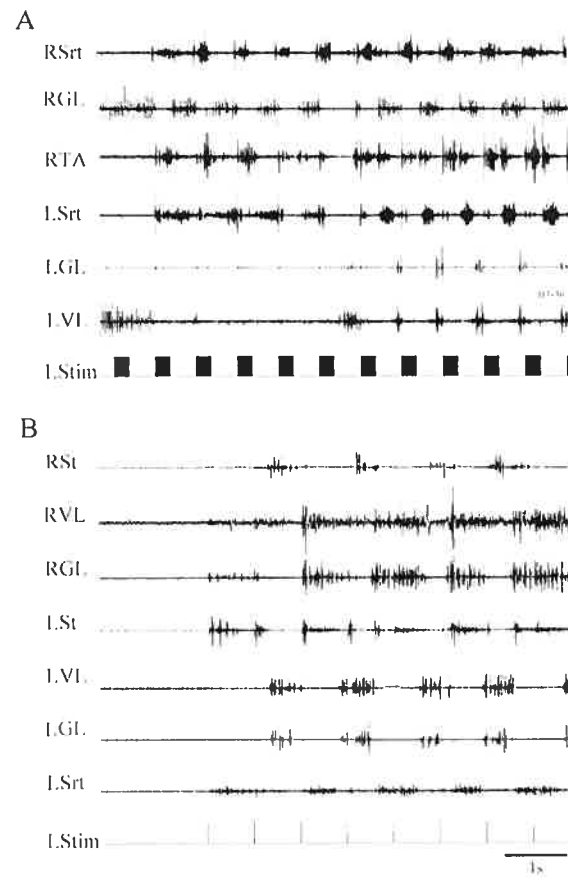
Stick figure, joint angular displacement and EMG averaging of a bilateral locomotion sequence evoked by perineal stimulation (A), by tonic stimulation applied in Mid L3, 1.5 mm left from the midline; stim: 50 $\mu$ A, 2Hz (B) and by train stimulation applied in Mid L4, 1.9 mm left of the midline; stim: 90  $\mu$ A, 300 Hz, 50 p, 0.8 tr/s (C).



***Article2-Figure 2-Trains of pulses evoke contralateral locomotor activity in spinal cats.***

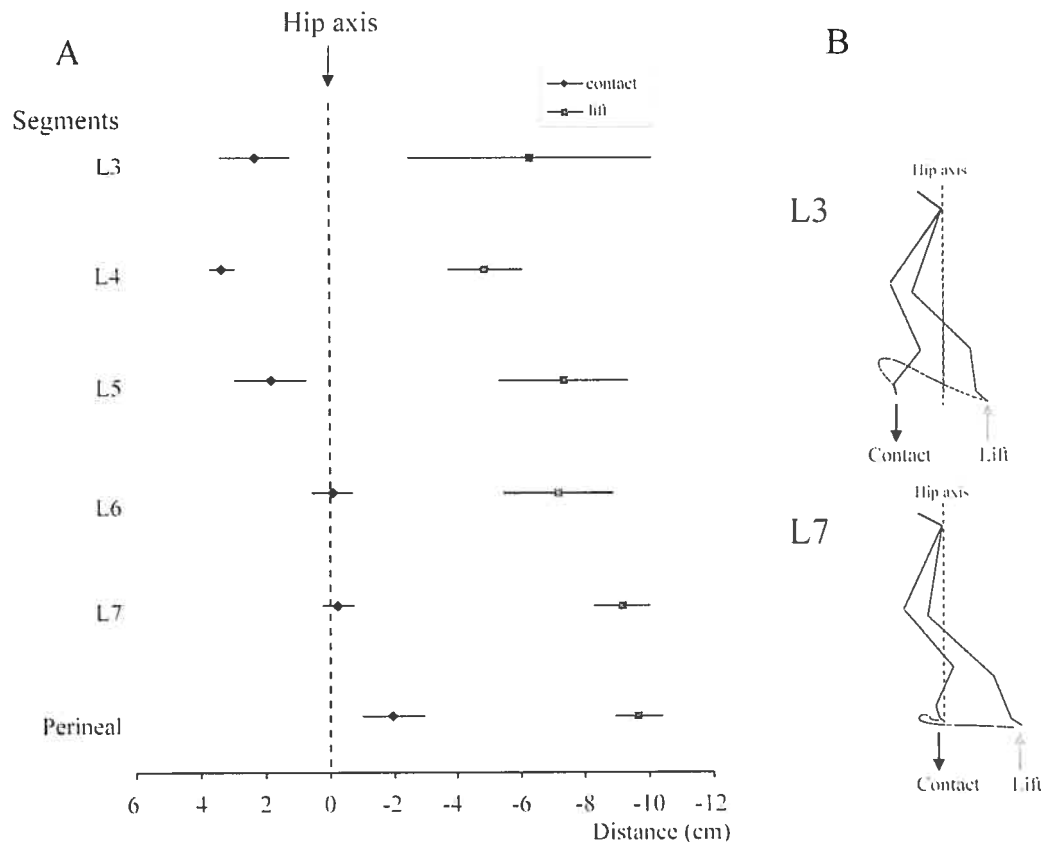
Train stimulation applied at Caudal L5, dorsal surface, 0.5 mm left of the midline evoked locomotor activity in the right hindlimb only. Note the rhythmic burst in the ipsilateral St that are out of phase with those of the RST. (stim:40  $\mu$ A, 300 Hz, 500 ms, 0.6 train/s)





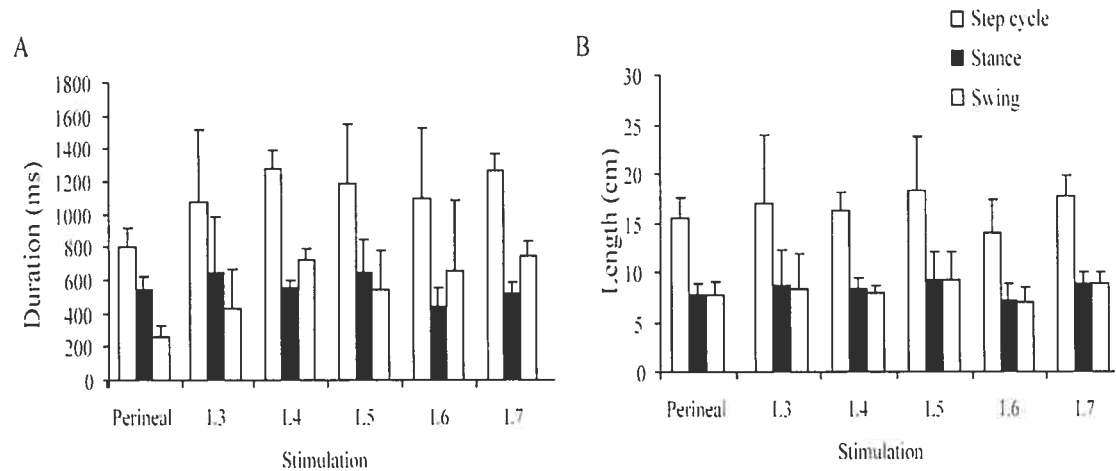
**Article2-Figure 3-Induction of locomotion by electrical stimulation**

EMG traces of the two main patterns of induction of locomotion by ISMS. They are both observed in train and tonic stimulation equally. In A, stimulation is applied at Mid L3, 1 mm left of the midline and 0.5 mm below the dorsal surface; stim: 20  $\mu$ A, 300 Hz, 500 ms, 0.8 train/s. In B, stimulation is applied on the dorsal surface of Mid-L3, 0.5 mm from the midline; stim: 20  $\mu$ A, 2 Hz)



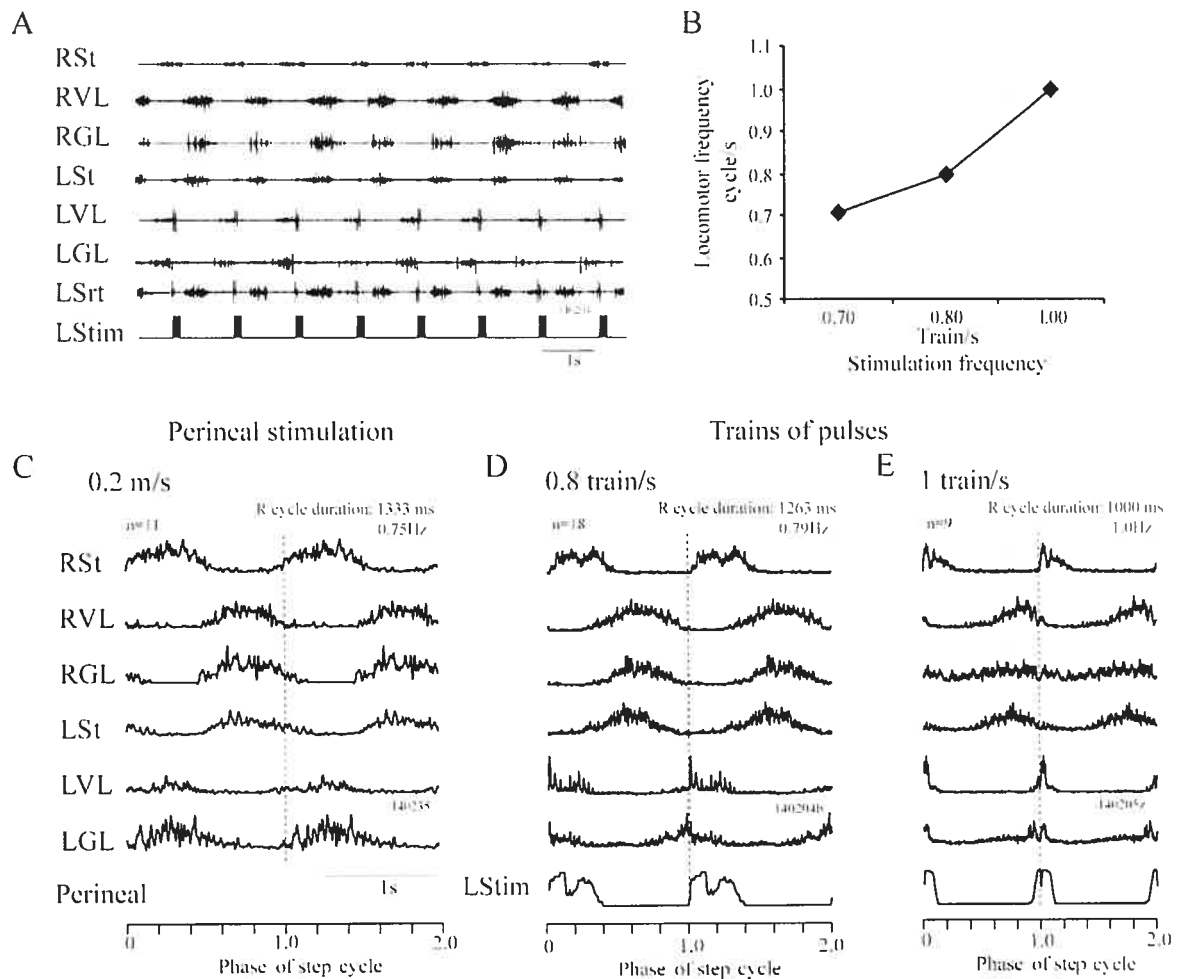
#### Article2-Figure 4-Effect of the segment stimulated on locomotion

Figure 4A displays the excursion of the hindlimb during locomotion induced by stimulation at different levels and with perineal stimulation. The x axis corresponds to the distance in mm in front (positive values) or behind (negative) a vertical axis passing through the hip articulation (0). The y axis corresponds to the different segments tested in this cat, where L3 is the furthest up on the y axis and L7 further down on the axis. Perineal stimulation is also displayed on this figure and is near the origin of the y axis. Black diamond ( $\blacklozenge$ ) represent the position of the toe when it touches the treadmill after the swing and black squares ( $\blacksquare$ ) represent the position of the toe when it lifts from the treadmill after the stance phase. Each diamond is paired with a square that is at the same Y coordinate, representing the spinal segment stimulated, and for each symbols the standard deviation bar is presented. Stimulation was applied 0.5 mm left of the midline in all segments. Stimulation at L3: 40 $\mu$ A, 300 Hz, 50p, 1 tr/s; L4-L5: 40 $\mu$ A, 300 Hz, 50p, 0.8tr/s; L6-L7: 30 $\mu$ A, 300 Hz, 50p, 0.8 tr/s.



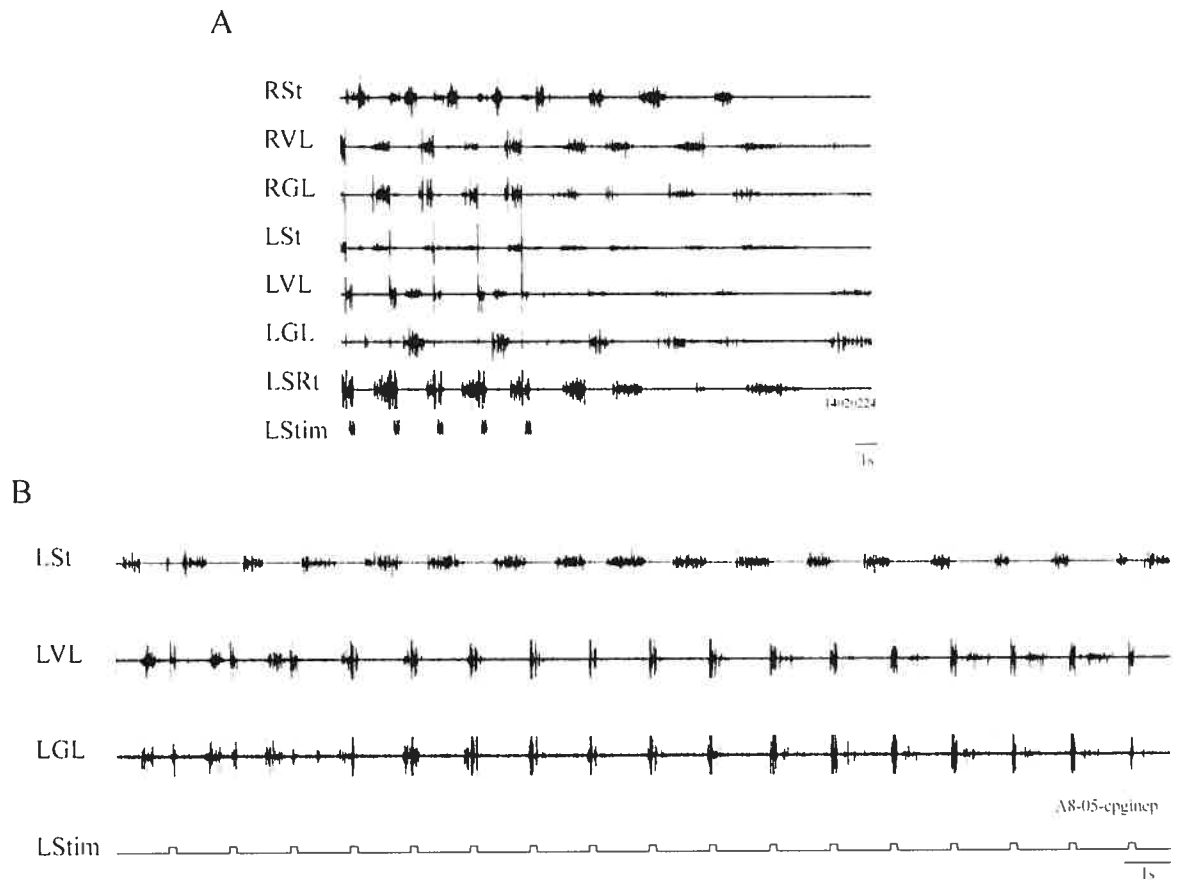
**Article2-Figure 5-Duration and length of the locomotor sequences displayed in Figure 4**

The histograms illustrates the duration (A) and the length (B) of the step cycle (white), and of its two components, namely the stance (black) and the swing (grey) phases, per segment stimulated, as well as during perineal stimulation.



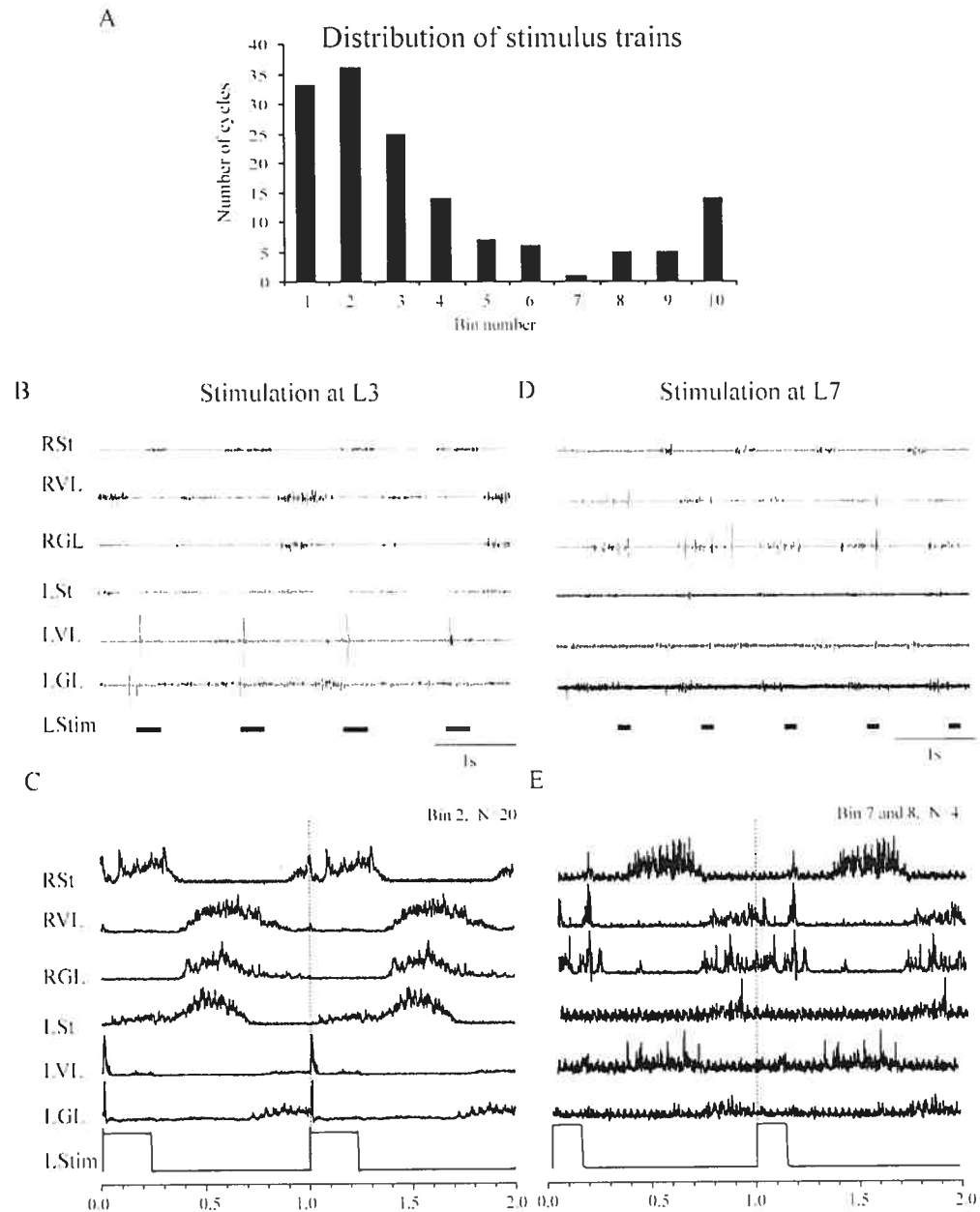
### Article2-Figure 6-Entrainment of the locomotor cycle

A) Hindlimb EMGs of locomotion triggered by electrical stimulation (30  $\mu$ A, 300 Hz, 166 ms, 0.8 train/s) applied on the dorsal surface of Mid L3, 1mm left of the midline. Stimulation trains always occur at the same time in the locomotor cycle. B) Curve of entrainment in the same cat, where locomotor frequency is plotted against stimulation frequency. C) Rectified, averaged and normalized EMG of locomotion evoked by a perineal stimulation; by trains of pulses at a rate of 0.8 train/s (Mid-L3, dorsal surface, 1 mm laterally; stim: 30  $\mu$ A, 300 Hz, 50 pulses); by trains of pulses at a rate of 1 train/s (Mid-L3, dorsal surface, 1 mm laterally; stim: 30  $\mu$ A, 300 Hz, 50 pulses). In this figure, the frequency of the locomotor cycle is expressed in Hz.



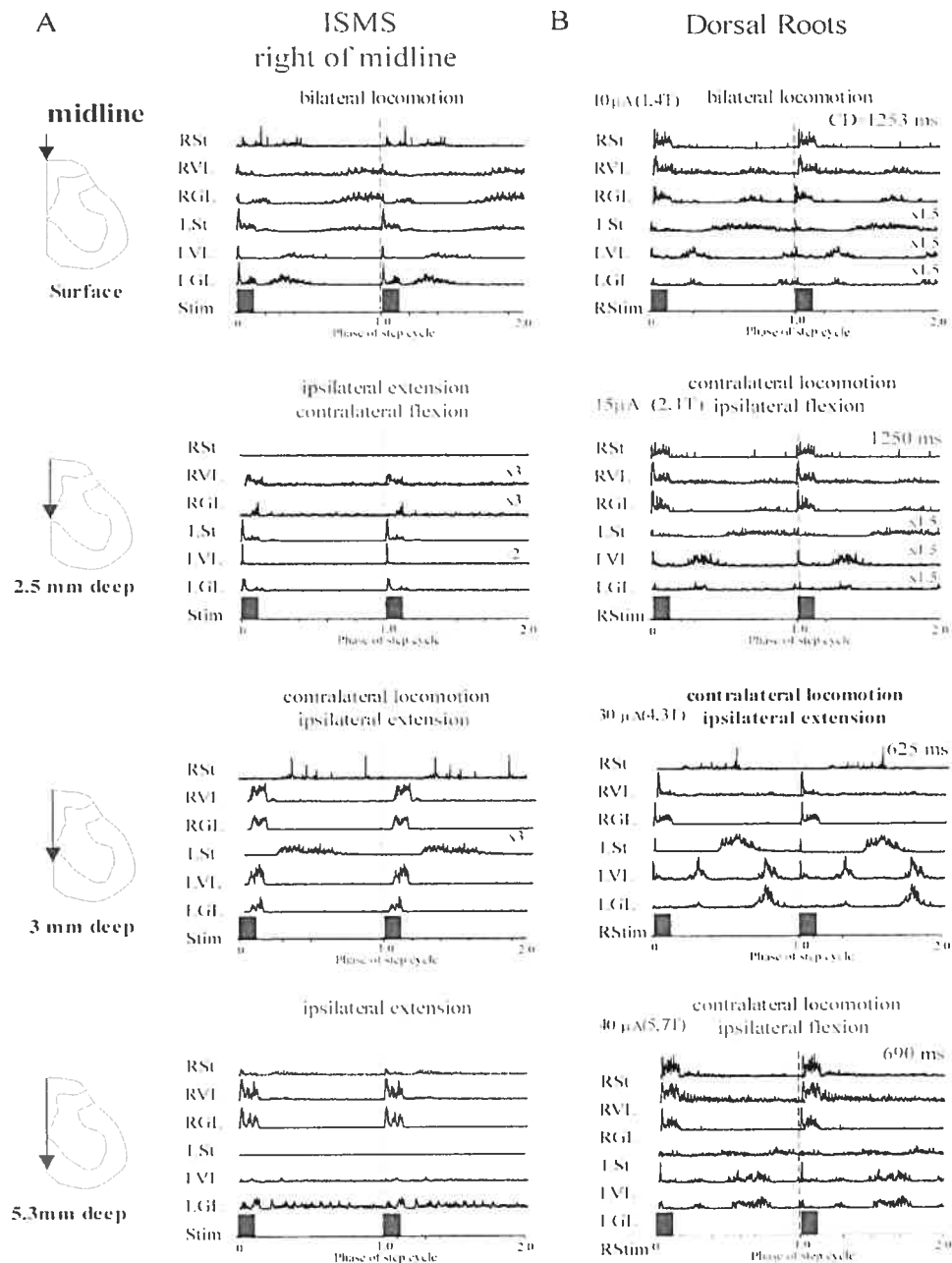
**Article2-Figure 7-Non entrainment of the locomotor cycle**

In A, locomotor activity induced by the stimulation (Rostral L4, 0.5 mm deep, 1 mm laterally; stim: 50 $\mu$ A, 300 Hz, 166 ms, 1 train/s) continues beyond the end of its application in an untrained spinal cat. In B, frequency of locomotion does not follow the frequency of stimulation. Ipsilateral VL discharge spontaneously before the stimulation-induced burst at the beginning of this sequence. It then discharges in phase with the stimulation bursts towards the middle of the sequence but after about 6 trains, the VL burst is observed after the stimulation induced-train.



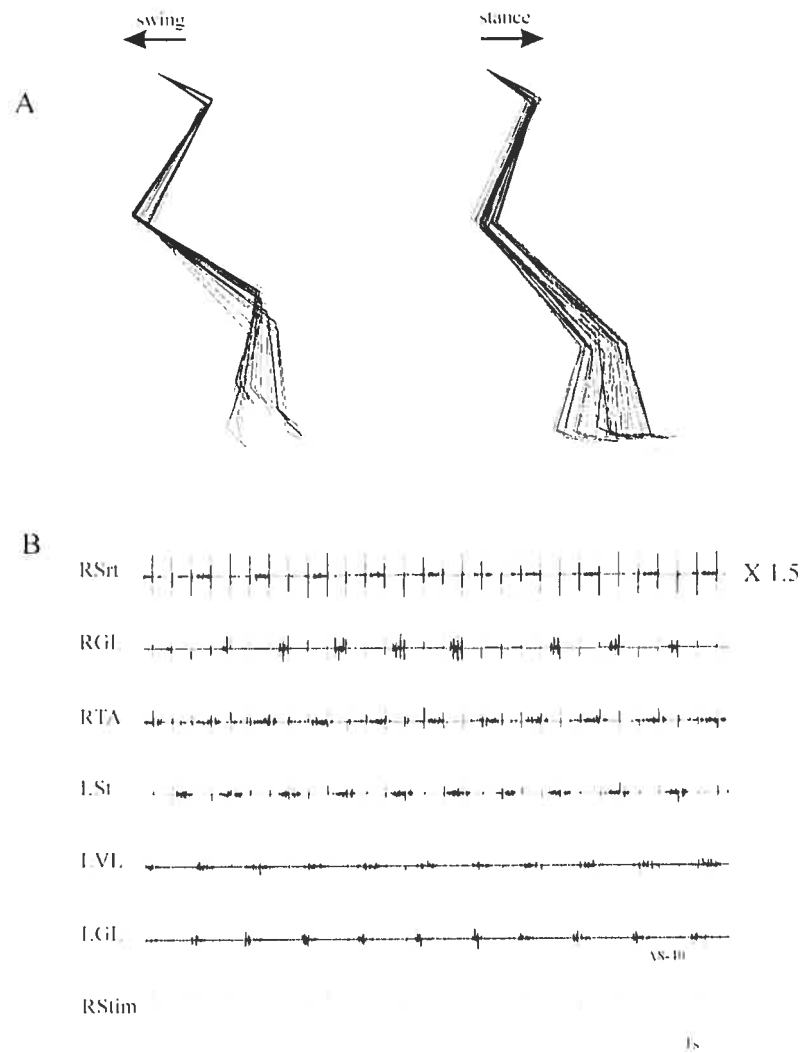
### Article2-Figure 8-Distribution and effect of train stimulation

A) Locomotor cycle is synchronised on contralateral St (RSt) and is divided in 10 bins. The first five bins correspond roughly to the activity of the contralateral flexor muscles and ipsilateral extensor muscles while the bins 5 to 10 correspond to the activity of the contralateral extensor muscles and ipsilateral flexor muscles. B) Sequence of bilateral locomotor response when stimulating at L3, 1mm laterally (stim: 30  $\mu$ A, 150 Hz, 200 ms, 0.8 tr/s). The shaded area corresponds to a stimulation train occurring in bin #2. An average of all trains occurring at that bin was made and the result is shown in C) where the effect of the stimulation train is presented. D) and E) same description as for B) and C) for a stimulation applied at L7, 1 mm left of the midline. (stim: 30  $\mu$ A, 300 Hz, 200 ms, 1 tr/s).



**Article2-Figure 9-Comparison of ISMS and dorsal root stimulation at segment L7 in the same cat**

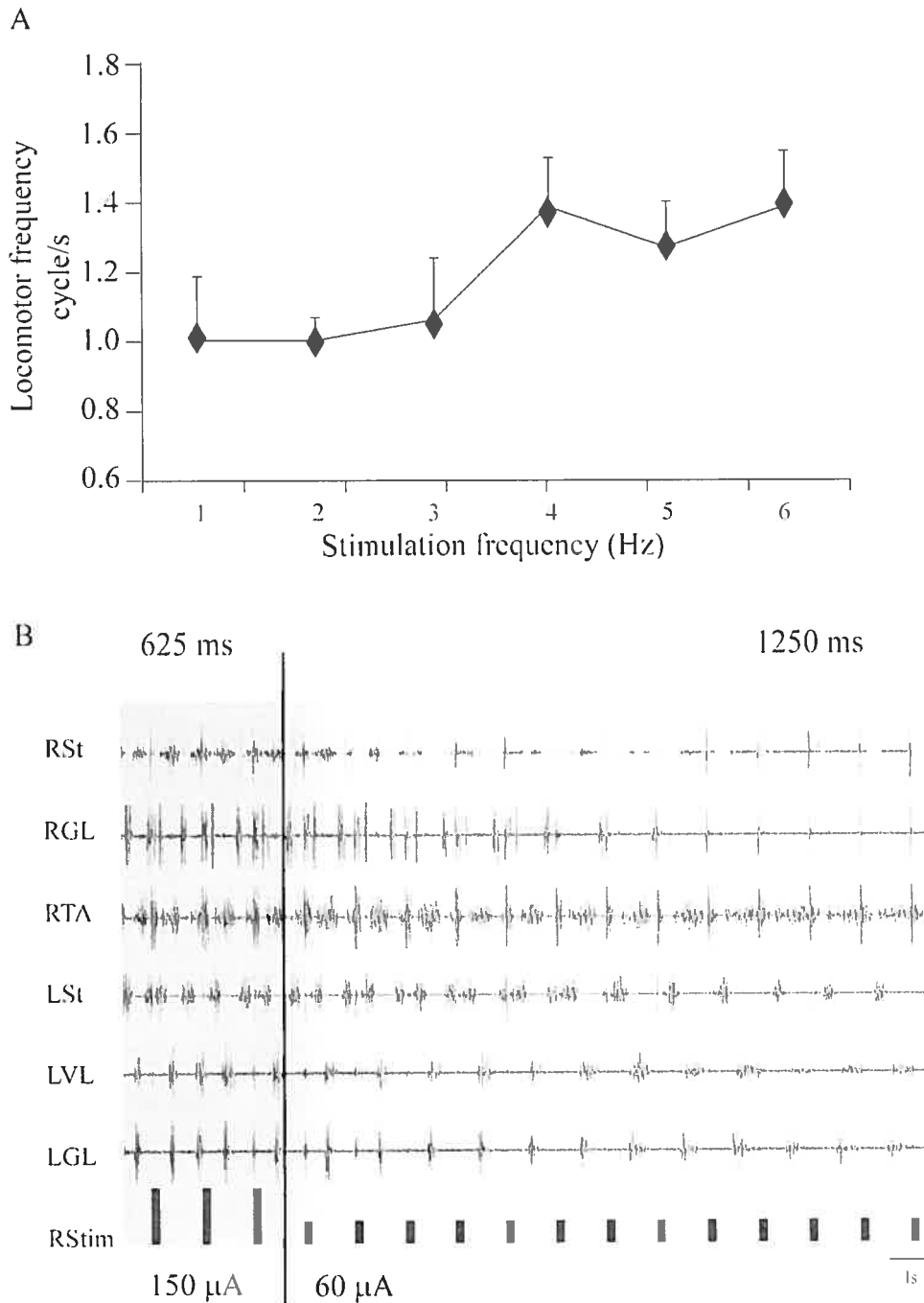
In A, ISMS applied slightly to the right of the midline of segment mid-L7. Stimulating at different depth induced different pattern of responses; stim: 40  $\mu$ A, 300 Hz, 50p, 0.8tr/s. In B, stimulation of the L7 dorsal root induce different pattern of responses depending on the intensity used; stim: 300Hz, 50p, 0.8tr/s; T:threshold=7  $\mu$ A.



**Article2-Figure 10-Locomotion induced by dorsal root stimulation**

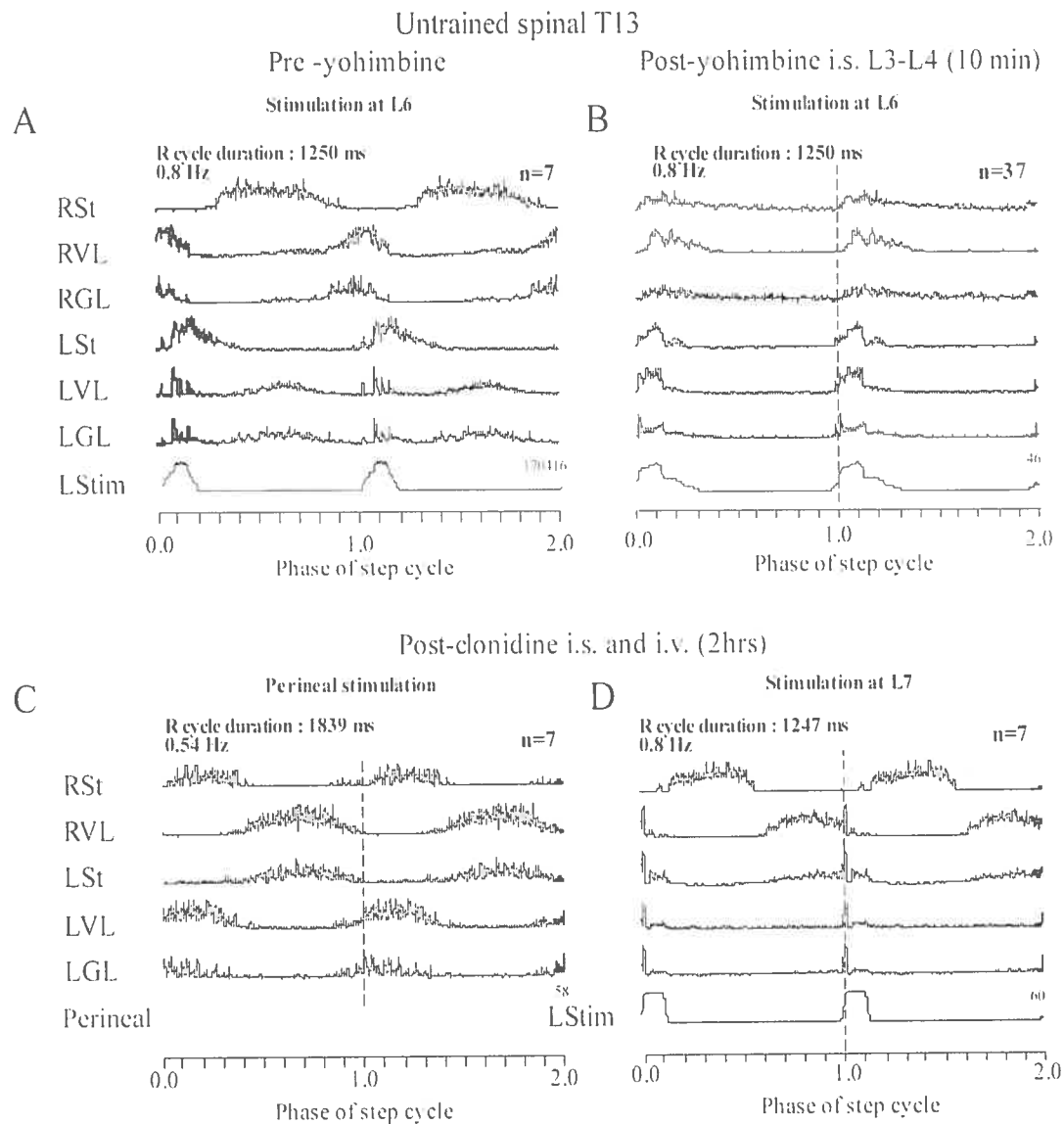
Stick figure (A) and EMG traces (B) during bilateral locomotion induced by stimulation of right dorsal root L4; stim: 200  $\mu$ A, 3 Hz.





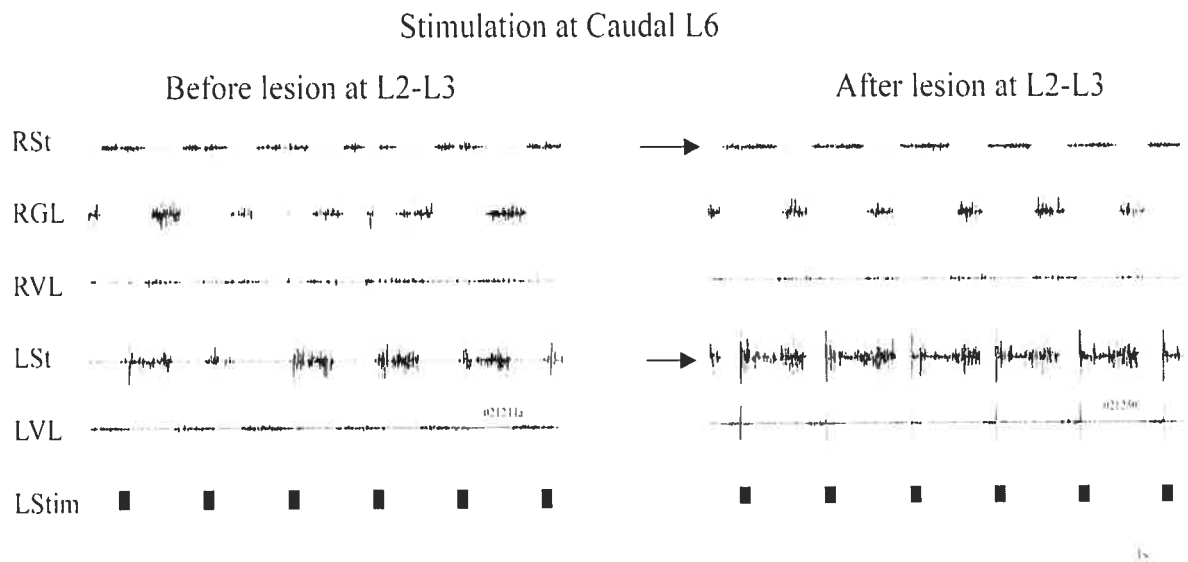
**Article2-Figure 11-Effect of intensity and frequency of stimulation on locomotion**

A) Tonic stimulation (200  $\mu$ A) of a single L4 dorsal root at 1 to 6 Hz can induce locomotion and influence the locomotor rhythm obtained. B) Rapid and vigorous locomotion is induced by electrical stimulation at 150  $\mu$ A (cycle duration: 625 ms). Decrease of intensity to 60  $\mu$ A evokes a gradual decrease of bilateral locomotor rhythm and when the locomotor rhythm is stabilised only contralateral locomotor activity could be induced, the latter being entrain by the stimulation (cycle duration: 1250 ms). Stim: 300 Hz, 200 ms, 0.8 tr/s



**Article2-Figure 12-Effects of intraspinal microinjections of yohimbine at L3-L4 on electrically induced locomotion in an untrained spinal cat**

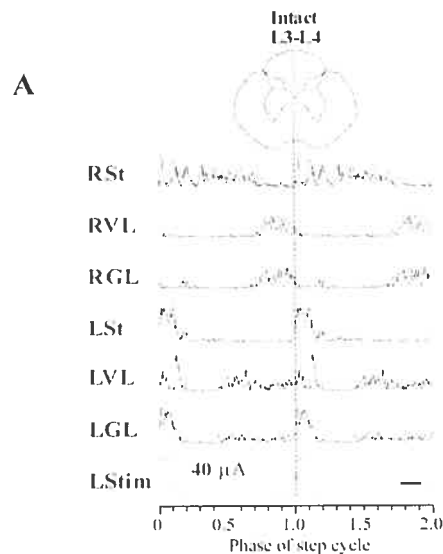
A, Rectified, averaged and normalized EMG of locomotion induced by train of stimuli (Rostral L6; 90  $\mu$ A, 300 Hz, 166 ms, 0.8 train/s); B, 10 minutes after intraspinal injection of yohimbine; C, Locomotion with perineal stimulation was reinstated following clonidine i.v.; D, Contralateral locomotor activity could also be evoked following clonidine with train of stimuli (Rostral L7; 90  $\mu$ A, 300 Hz, 166 ms, 0.8 train/s).



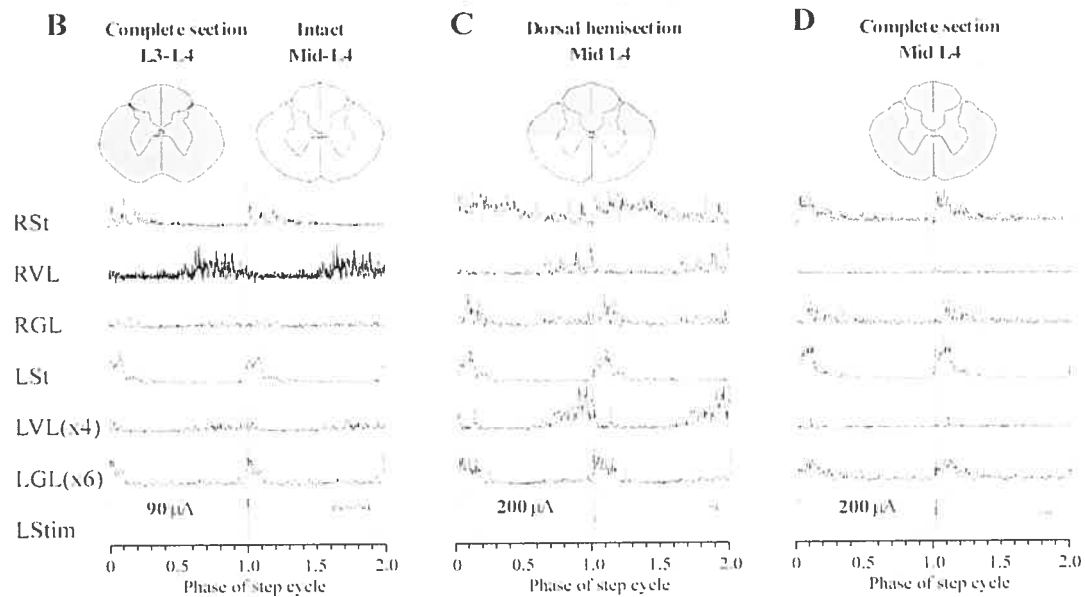
***Article2-Figure 13-Effect of a spinal lesion at L2***

Stimulation at Caudal L6 induces bilateral locomotion that persists after a complete acute lesion at L2, though a higher intensity was necessary ( $40\mu\text{A}$  before lesion and  $70\mu\text{A}$  after lesion). Note the increase of activity in both RSt and LSt. Stim: 300 Hz, 200 ms, 0.8 tr/s. The arrows point to the increased discharge of the knee flexor St, after the spinal lesion at L2.

**Trained five-week spinal T13 with clonidine i.v.**  
**Stimulation at Mid L6**

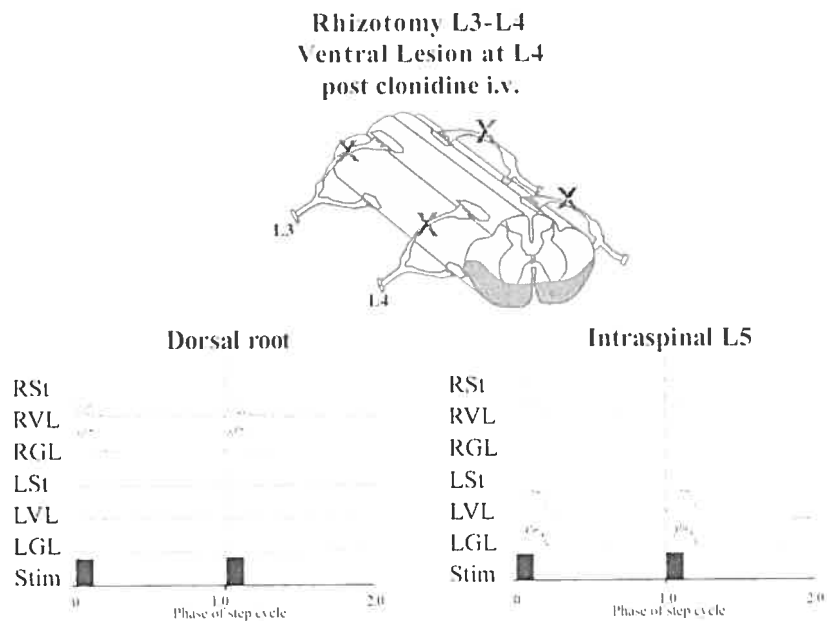
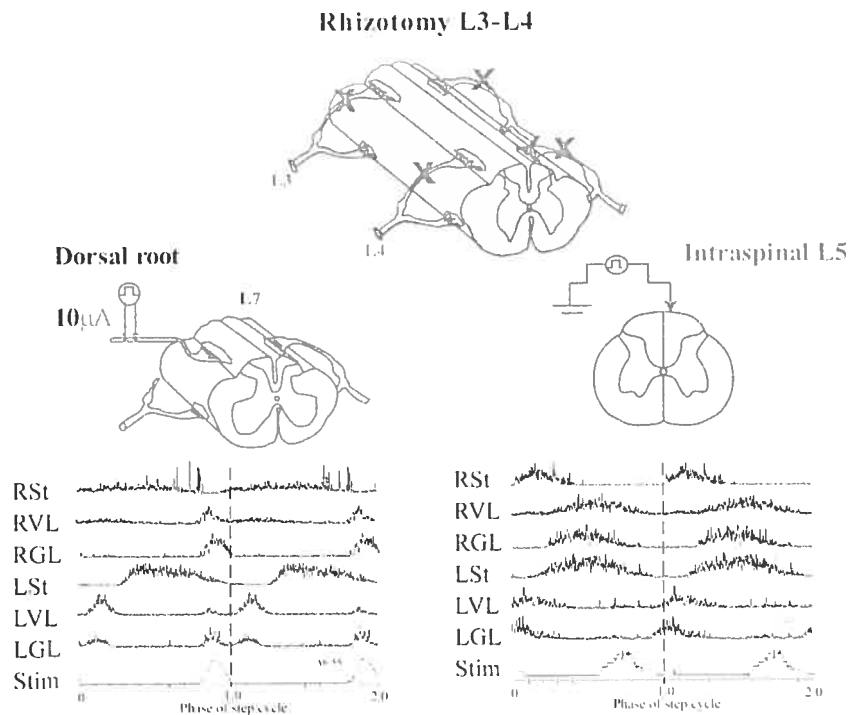


**Complete section at L3-L4 and progressive lesion at Mid-L4**  
**Stimulation at Mid L7**



**Article2-Figure 14-Progressive spinal section in a trained spinal cat**

A, EMGs of locomotion evoked by stimulation (300 Hz, 166 ms, 0.8 train/s) at mid L6 segment while L3-L4 segments were intact. B, stimulation applied at L7 can elicit locomotion after a complete section at L3-L4; C, Dorsal hemisection at mid-L4 did not block the initiation of locomotion by L7 stimulation; D, a complete section at mid-L4 stopped locomotion induced by electrical stimulation of L7. The intensity of each stimulation is indicated under each EMG traces.



**Article2-Figure 15-Effect of bilateral rhizotomy at L3-L4 and of ventral lesion at L4**

Upper traces, Acute bilateral rhizotomy at L3-L4 does not stop locomotion induced by L7 dorsal root stimulation or ISMS applied in the dorsal surface of junction L5-L6, 0.5 mm left of the midline. Lower traces, Ventral lesion at Caudal L4 abolishes locomotion induced by either mean of stimulation at more caudal segments, up to an hour after ventral lesion. Stim: 40  $\mu$ A, 300 Hz, 200 ms, 0.8 tr/s.

## Tables

Table 1. Locomotor coupling-untrained spinal cat

### Perineal stimulation

Cats	N	Interlimb coupling		Intralimb coupling	
		St	VL or GL	Right	Left
#1	27	0.47±0.15 (32%)	0.58±0.1 (17%)	0.45±0.12 (26%)	0.56±0.13 (23%)
#2	21	0.52±0.06 (12%)	0.49±0.06 (12%)	0.49±0.07 (14%)	0.46±0.07 (15%)
#3	37	0.66±0.12 (18%)	0.45±0.15 (33%)	0.56±0.13 (23%)	0.35±0.15 (43%)

### ISMS

Cats	N	Interlimb coupling		Intralimb coupling	
		St	VL or GL	Right HL	Left HL
#1	54	0.45±0.13 (28%)	0.5±0.14 (28%)	0.5±0.12 (24%)	0.54±0.16 (30%)
#2	20	0.47±0.15 (32%)	0.39±0.17 (44%)	0.48±0.11 (23%)	0.41±0.17 (41%)
#3	69	0.51±0.14 (27%)	0.56±0.14 (25%)	0.53±0.11 (21%)	0.59±0.13 (22%)

***Article2-Table 1. Locomotor coupling in untrained spinal cat***

This table displays the values for interlimb coupling between right and left flexor muscles (St) as well as between right and left extensor muscles (VL or GL) during locomotion induced by perineal stimulation or ISMS. Interlimb coupling compares the onset of EMG burst of the same muscle in the left and the right hindlimb. Interlimb coupling based on St, VL or GL compares the onset of St, VL or GL EMG bursts respectively, in the right and left hindlimb. A coupling of 0.5 means that there is a perfect reciprocity between the two muscles studied. Intralimb coupling compares the onset of a flexor and an extensor muscle in the left or the right hindlimb (HL). It also displays the values of intralimb coupling, between flexor and extensor muscles of the same limb (right or left). The percentage of variation is indicated in brackets. The data of 3 cats are represented in this table (cat #1, #2 and #3) and the number of cycles analysed is indicated in the N column.

## Locomotor coupling-trained spinal cat

## Perineal stimulation

Cats	N	Interlimb coupling		Intralimb coupling	
		St	Gl	Right	Left
#4	23	0.4±0.08 (20%)	0.59±0.1 (17%)	0.29±0.05 (17%)	0.52±0.09 (17%)
#5	19	0.49±0.05 (10%)	0.51±0.06 (12%)	0.42±0.07 (16%)	0.45±0.07 (15%)

## Electrical stimulation

Cats	N	Interlimb coupling		Intralimb coupling	
		St	Gl	Right	Left
#4	15	0.47±0.1 (21%)	0.45±0.07 (15%)	0.47±0.04 (8%)	0.56±0.12 (21%)
#5	9	0.63±0.13 (21%)	0.43±0.06 (14%)	0.59±0.09 (15%)	0.39±0.05 (13%)
#6	46	0.31±0.08 (26%)	0.59±0.07 (12%)	0.31±0.08 (26%)	0.41±0.08 (20%)

B3, A7, B15

**Article2-Table 2. Locomotor coupling in trained spinal cat**

This table displays the values for interlimb coupling between right and left flexor muscles (St) as well as between right and left extensor muscles (VL or GL) during locomotion induced by perineal stimulation or ISMS. It also displays the values of intralimb coupling, between flexor and extensor muscles of the same limb (right or left). The data of 3 cats are represented in this table (cat #4, #5 and #6), but the data of only two of those cats are presented during perineal stimulation. The number of cycles analysed is indicated in the N column. The percentage of variation is indicated in brackets.



## Chapitre IV - DISCUSSION GÉNÉRALE

---

Les travaux effectués au cours de ce doctorat ont des retombées au niveau de notre compréhension fondamentale des mécanismes locomoteurs, mais aussi au niveau des applications cliniques possibles. Dans un premier temps, un résumé global des articles sera présenté. Les résultats seront par la suite mis en contexte par rapport à notre compréhension actuelle du contrôle moteur au niveau de la moelle épinière, de la locomotion et plus généralement par rapport au champ d'application de la stimulation électrique. Quelques expériences complémentaires à celles présentées dans cette thèse, et qui pourraient solidifier les notions mises de l'avant dans ce travail, seront aussi présentées. Finalement, les implications fonctionnelles de ces travaux et leur portée clinique d'une telle application seront discutées.

### Résumé des articles

#### Stimulation de la moelle épinière à l'aide d'une électrode

La stimulation électrique à basse intensité (20-90 $\mu$ A) à l'aide d'une seule électrode pourrait donc évoquer la locomotion, mais il est difficile de déterminer avec certitude les éléments qu'elle active. Il a été estimé qu'une stimulation électrique à une intensité de moins de 100  $\mu$ A diffuserait à travers une région circonscrite dans un diamètre de 1 mm (Bagshaw et Evans, 1976; Gustafsson et Jankowska, 1976; Jankowska et Roberts, 1972; Lemay et Grill, 2004a; Porter, 1963; Tai et al, 2003; Yeomans et al, 1986). Les réponses directes à la stimulation seraient dues à l'activation d'éléments très proches de l'extrémité de l'électrode, comme les dendrites, les corps cellulaires et les fibres ascendantes et descendantes de gros calibre. La portée restreinte de la stimulation est aussi démontrée par des sites où les réponses sont absentes ou à peine visibles. À une même intensité de stimulation, des réponses franches sont déclenchées en dorsal et en ventral de ce site d'hypoexcitabilité. Ces régions sont principalement retrouvées dans la zone intermédiaire et pourraient contenir des interneurons inhibiteurs ou des interneurons projetant vers des cibles supraspinales, ou du moins supralombaires. Suite à la spinalisation, l'effet de la stimulation de ces neurones ne pourrait donc pas être observé.

Bien que la stimulation électrique constitue un moyen non physiologique d'activation neuronale, les réponses évoquées par ce moyen à différents sites de la moelle épinière sont reproductibles. De plus, les caractéristiques de ces réponses correspondent à la description de réflexes spinaux connus et leur localisation correspond à celle de motoneurones et d'interneurones impliqués dans ces voies réflexes.

### **Article 1-Distribution de réponses unilatérales, bilatérales et locomotrices**

La stimulation intraspinale permet d'évoquer différents types de réponses, chacune étant distribuée préférentiellement selon un gradient rostrocaudal, médiolatéral et dorsoventral. Les réponses de flexion ipsilatérale et bilatérale sont évoquées dans tous les segments, principalement dans les régions dorsales, alors que les extensions ipsilatérales et bilatérales sont principalement activées dans les segments caudaux et dans les régions ventrales. Cependant, contrairement aux réponses ipsilatérales qui sont surtout évoquées latéralement, les réponses bilatérales sont évoquées médialement. Des réponses mixtes de flexion/extension ont aussi été évoquées. Dans la patte ipsilatérale, nous avons observé une réponse de flexion suivie d'extension et bilatéralement, nous avons observé des réponses croisées de flexion ipsilatérale accompagnée d'extension contralatérale. Cette dernière réponse était évoquée dans tous les segments et à toutes les latéralités plus ou moins également, mais les régions ventrales et intermédiaires étaient plus efficaces.

Les réponses locomotrices principales, i.e. la locomotion contralatérale et bilatérale, étaient évoquées dans tous les segments plus ou moins également. La locomotion contralatérale est induite essentiellement par la stimulation des régions médianes de la moelle épinière tant au niveau dorsal que ventral. Au contraire, la locomotion bilatérale peut être évoquée à différentes latéralités, mais seulement dans les quadrants dorsaux. La locomotion ipsilatérale a rarement été évoquée. La stimulation électrique accèderait donc au réseau locomoteur mais ne semble pas agir sur d'autres réseaux rythmiques présents dans la moelle épinière, notamment le grattage, qui n'a pas été observé.

### Effet de la clonidine et de l'entraînement

La distribution spinale des réponses engendrées par la stimulation électrique est relativement stable avant et après clonidine chez les chats spinaux d'une semaine non-entraîné, mais peut varier chez les chats entraînés de 3 à 5 semaines. De plus, la proportion relative des différentes réponses change de manière importante après clonidine que ce soit dans une préparation entraînée ou non. En effet, les chats spinaux non-entraînés d'une semaine démontrent une proportion importante de flexion qui diminue après clonidine ou après un entraînement locomoteur. Parallèlement, les réponses complexes de locomotion sont plus souvent évoquées après injection de clonidine, principalement au niveau des segments L3, L4 et L5. L'effet de l'entraînement est particulièrement évident dans la condition pré-clonidine, où une augmentation importante des réponses locomotrices est observée au niveau des segments L6 et L7. En définitive, une augmentation des réponses locomotrices est observée après injection de clonidine et suite à un entraînement locomoteur. La clonidine pourrait donc activer prématurément des voies spinales qui deviendraient plus excitable avec la chronicité et l'entraînement locomoteur.

Dans notre montage expérimental, il était très difficile de déclencher la locomotion avec les stimuli habituels (mouvement du tapis roulant et stimulation périnéale) sans avoir à combiner ces techniques à une stimulation pharmacologique. Ce constat a aussi été fait chez les chats spinaux qui ont récupéré la locomotion sur tapis roulant. Les fixations spinales utilisées pour immobiliser le chat pourraient en être la cause. Ces solides fixations sont nécessaires pour diminuer les mouvements de la moelle épinière liés à la respiration ou aux mouvements des membres, et sont essentielles pour assurer des stimulations précises et répétées. Cependant les signaux nociceptifs qu'elles évoquent ont sûrement induit un changement d'excitabilité spinale et rendu l'expression de la locomotion plus difficile ou incomplète.

## **Article 2-Caractéristiques et mécanismes de la locomotion induite**

### Paramètres optimaux et caractéristiques de la locomotion

Le deuxième article décrit les caractéristiques de la locomotion évoquée par la stimulation intraspinale chez des chats ayant reçu de la clonidine. Une stimulation tonique dont la durée des impulsions varie de 200 à 300  $\mu$ s et appliquée à faible intensité (20-90

$\mu\text{A}$ ) et à basse fréquence (1 à 6 Hz) est optimale pour évoquer la locomotion bilatérale. De même, une stimulation par train à basse intensité et dont la fréquence se situe entre 0.65 et 1 train/s s'avère très efficace. Ces fréquences ont été obtenues alors que le chat marchait sur le tapis roulant à une vitesse de 0.2 m/s.

La stimulation intraspinale induit une locomotion semblable à celle obtenue par la stimulation périnéale. Cependant, une plus grande variabilité est observée dans le couplage entre les membres postérieurs droit et gauche et entre les muscles fléchisseurs et extenseurs d'un même membre chez un chat spinal non-entraîné. Les pas sont plus réguliers chez les chats entraînés. Les caractéristiques de la locomotion évoquée varient selon le segment stimulé : une stimulation dans les segments rostraux induit une flexion avant importante au cours du balancement, ce qui permet à la patte de contacter le sol à une position plus antérieure que lors de la stimulation des segments caudaux. À l'opposé, une stimulation de ces segments caudaux induit une extension plus grande de la patte au cours de la phase d'appui. Ainsi, la patte commence la phase de balancement à une position plus postérieure que lors de la stimulation des segments plus rostraux. La stimulation périnéale présente un patron locomoteur beaucoup plus proche de celui évoqué par la stimulation des segments caudaux.

La stimulation par train des différents segments évoque aussi des réponses à courte latence pendant la locomotion. Ces réponses sont variées mais en général, les trains de stimulation facilitent la flexion ipsilatérale lorsqu'appliquée dans les segments rostraux et l'extension ipsilatérale lorsqu'appliquée dans les segments caudaux. La distribution des réponses obtenues par stimulation des segments rostraux (reliés à la flexion) et des segments caudaux (reliés à l'extension) est corrélée à la distribution des motoneurones des muscles fléchisseurs et extenseurs de la hanche, tel que décrit par Vanderhorst et Hostege (1997).

### Mécanismes d'induction de la locomotion

Nous avons également étudié les mécanismes qui pourraient sous-tendre l'induction de la locomotion par la stimulation électrique. La stimulation unilatérale des

racines dorsales de L3 à S2 évoque les mêmes types de réponses décrites avec la stimulation intraspinale (ipsilatérale, bilatérale et locomotrice) et peut aussi induire la locomotion. Ces résultats suggèrent que les voies afférentes seraient impliquées dans la production de la locomotion lorsque la stimulation électrique est appliquée au niveau des régions dorsales. Le rythme locomoteur induit peut être influencé par la fréquence des stimulations électriques intraspinales ou des racines dorsales. La locomotion pouvait même être entraînée (1 :1) par une stimulation par train à l'intérieur d'une plage restreinte de fréquences et d'intensité. Ce qui suggère que des éléments activés par la stimulation électrique partagent des voies synaptiques avec le générateur central de rythme locomoteur (Conway et al, 1987; Pearson et al, 1992; Schomburg et al, 1998). Cependant certaines séquences locomotrices ne pouvaient être entraînées par notre stimulation et étaient indépendantes de la fréquence ou de l'intensité.

Des microinjections de yohimbine, un antagoniste noradrénergique, ainsi que des lésions spinales complètes ont été effectuées au niveau des segments L3 et L4. Ces manipulations ont aboli la locomotion évoquée par la stimulation intraspinale ou des racines dorsales des segments plus caudaux. Ceci suggère que l'intégrité de ces segments est essentielle à l'induction d'une activité locomotrice. De plus, les résultats obtenus lors des lésions spinales dorsoventrales progressives et des lésions des quadrants ventraux suggèrent l'implication prépondérante des voies ventrales et/ou ventrolatérales dans l'activation des segments L3-L4.

## **Mise en contexte des résultats**

### **Cartographie de la moelle épinière**

Les résultats du premier article sont révélateurs de l'organisation de la moelle épinière. En effet, les différentes régions de la moelle épinière spinales génèrent des réponses distinctes et une corrélation peut être faite avec la localisation des interneurons de la moelle épinière et des voies réflexes.

### Influence des interneurones contactés par les voies descendantes

Les réponses ipsilatérales, bilatérales et locomotrices correspondent à des patrons de réflexes décrits dans la littérature (Sherrington, 1910; Schouenborg, 2002), et peuvent être corrélées à la distribution de certains types de neurones. Par exemple, la distribution dorsale des réponses de flexion (ipsilatérale et bilatérale) et la distribution ventrale des réponses d'extension (ipsilatérale et bilatérale) peuvent refléter l'organisation topographique des voies descendantes ainsi que des interneurones contactés par ces voies. Tel que discuté dans l'introduction, les voies vestibulo- et réticulospinales descendent dans les quadrants ventraux et ventrolatéraux et activent principalement les muscles extenseurs, via des interneurones localisés ventralement dans la matière grise (Orlovsky, 1972; Armstrong, 1986; Drew et Rossignol, 1984; Kuypers, 1963; Kuypers, 1964). De même, les voies cortico- et rubrospinales projettent dans le funicule dorsolatéral et activent principalement les muscles fléchisseurs, via les interneurones localisés dorsalement dans la matière grise (Kuypers, 1963; Kuypers, 1964; Armstrong et Drew, 1984; Orlovsky, 1972). Les réponses observées ne seraient pas liées à l'activation des voies descendantes restantes, dont les terminaisons sont exemptes de neurotransmetteurs environ une semaine après spinalisation (Anden et al, 1972). D'ailleurs une polarité fléchisseur/extenseur est également observée chez les chats spinaux de 3 à 5 semaines, alors que les axones des voies descendantes ont sûrement dégénérés. Aussi, ces gradients reflèteraient plutôt la stimulation des interneurones contactés par ces afférences (Tresch et Bizzi, 1999; Lemay et Grill, 2004). Un tel gradient entre la flexion et l'extension a aussi été observé chez le chat anesthésié et décérébré (Lemay et Grill, 2004; Mushahwar et al, 2004; Tai et al, 2003b).

### Neurones commissuraux

La proportion élevée des réponses bilatérales dans les parties médianes de la moelle épinière serait principalement due à l'activation de voies commissurales dorsales, ventrales ou des neurones donnant naissance à ces voies (Petko et al, 2004; Petko M. et Antal, 2000; Harrison et al, 1986; Matsuyama, Nakajima, Mori, Aoki, et Mori, 2004b; Edgley et al, 2003a). Les voies commissurales ventrales, provenant des neurones de la lamina VIII, seraient aussi impliquées dans la locomotion controlatérale et bilatérale. D'ailleurs, les séquences locomotrices sont principalement évoquées par la stimulation des

sites près de la ligne médiane. Ces résultats corroborent une récente étude de Dai et al (2005) montrant qu'après une séquence prolongée de locomotion, les neurones marqués au *c-fos*, un facteur de transcription utilisé comme marqueur d'activité neuronale, sont localisés principalement dans la partie médiane de la moelle épinière. La stimulation électrique appliquée dans la présente étude pourrait activer les mêmes populations de neurones.

De plus, la locomotion controlatérale peut être évoquée dorsalement et ventralement (mais peu au niveau de la zone intermédiaire). Une stimulation électrique de la région dorsale pourrait activer les afférences aux neurones commissuraux de la lamina VIII, tandis qu'une stimulation plus ventrale pourrait recruter directement ces neurones. Ces derniers déchargent rythmiquement pendant la locomotion fictive chez le chat (Matsuyama et al, 2004) et leur implication dans la genèse de la locomotion a été démontrée plus directement chez les rats néonataux (Butt et al, 2002; Kiehn et Butt, 2003). La locomotion bilatérale est évoquée uniquement en stimulant électriquement les régions dorsales : au niveau des funicules dorsaux et dorsolatéraux et dans la corne dorsale. La stimulation de ces sites activerait les afférences sensorielles ou les interneurones recevant ces afférences. Cette localisation dorsale est en accord avec les résultats obtenus pour la locomotion induite par stimulation épидurale (Gerasimenko et al, 2003; Iwahara et al, 1991b) et par stimulation des colonnes dorsales (Grillner et Zangger, 1979).

#### Neurones recevant les afférences de réflexes de flexions (FRA)

Les projections croisées des interneurones FRA pourraient être impliquées dans la locomotion induite par stimulation électrique. D'abord, les séquences locomotrices commencent très souvent avec des bouffées d'activité EMG simultanées dans les muscles extenseurs controlatéraux et les muscles fléchisseurs ipsilatéraux. Cette activation est similaire au réflexe d'extension croisé, impliquant des interneurones commissuraux de la lamina VIII et des interneurones FRA (Jankowska et al, 1967a; Jankowska et al, 1967b; Jankowska, 1992). De même, les réponses à courte latence facilitent la flexion ou l'extension dans un membre et inhibent la réponse correspondante dans l'autre membre. En général les trains de stimulation appliqués dans les segments rostraux facilitent la flexion ipsilatérale et inhibent la flexion controlatérale. Au contraire, un train appliqué au niveau

des segments caudaux va faciliter l'extension ipsilatérale et inhiber l'extension controlatérale. Une variété de réponses croisées est évoquée par la stimulation des afférences du réflexe de flexion (Holmqvist, 1961). Il est fort probable qu'un des déterminants de la réponse évoquée pourrait être le segment stimulé. L'implication des afférences de réflexes de flexion a aussi été suggérée comme mécanisme dans l'induction de séquence locomotrices évoquées par stimulation épidurale (Gerasimenko et al., 2005b). Au cours de la stimulation à très basse fréquence (1 Hz), des réponses de longue latence (130-150 ms) ont été observées dans les muscles fléchisseurs chez les chats spinaux, alors qu'elles étaient absentes chez les chats décérébrés. Ces réponses seraient similaires à celles évoquées par la stimulation des afférences du réflexe de flexion chez le chat spinal traité avec la L-DOPA (Jankowska et al, 1967a; Jankowska et al, 1967b; Anden et al, 1966).

#### Gradients de réponses vs primitives

En fait, tous ces résultats solidifient notre compréhension de l'organisation motrice de la moelle épinière. L'optique de ces expériences n'est pas le même que celui adopté par le laboratoire du Dr Bizzi, qui utilise aussi la stimulation intraspinale pour déterminer l'organisation de la moelle épinière. En effet, l'hypothèse des primitives propose l'existence d'un nombre limité de modules ayant chacun un champ de force distinct, et qui pourraient contrôler la dynamique des membres (Bizzi et Clarac, 1999). La corrélation de ces résultats aux connaissances des circuits spinaux accumulées jusqu'à présent est difficile à faire.

Lemay et Grill (2004) ont tenté de faire le pont entre les deux points de vue, en corrélant la direction des vecteurs de force évoqués par la stimulation électrique et les laminae de la moelle épinière où la stimulation est appliquée. Cependant la préparation utilisée, où la hanche et le fémur sont fixes, ne permet pas d'observer le mouvement dans son ensemble. Étant donné que le mouvement de la hanche influence grandement le mouvement des articulations plus distales, le vecteur de force enregistré pour la stimulation d'un site donné pourrait, dans les faits, être bien différent.



### Plasticité

Les changements observés au niveau de la topographie des réponses entre les chats spinaux d'une semaine non-entraîné et les chats spinaux de 3 à 5 semaines entraînés confirment que des changements plastiques surviennent au niveau de la moelle après spinalisation. Malgré tout, les différences que nous avons observées au niveau de la locomotion ne sont pas aussi significatives que l'on aurait pu croire. Plusieurs hypothèses peuvent expliquer ce phénomène, notamment la durée de l'entraînement. Après spinalisation, la récupération de la locomotion atteint un plateau vers le 3e mois. Une étude portant sur des chats 3 mois après spinalisation, nous donnerait probablement un tableau différent de ce que l'on obtient à 1 semaine et 1 mois post-spinalisation. Ces différences se reflèteraient probablement au niveau de la carte topographique des réponses ou au niveau des caractéristiques de la locomotion induite.

Une autre explication réside peut-être dans les paramètres que nous avons étudiés. En effet, nous avons analysé la cinématique ainsi que le couplage des bouffées EMG, sans enregistrer la force déployée par les extenseurs lors de la phase d'appui. Hors, Côté et Gossard (2003) ont rapporté qu'un entraînement locomoteur de 3 à 5 semaines, induirait une modification de la transmission dans les voies Ib, cruciales lors de la phase d'appui. Une prochaine expérience pourrait donc consister à utiliser des électrodes flottantes (ou des microélectrodes) pour stimuler la moelle épinière de chats suspendus dans un harnais et non fixés au montage expérimental. L'utilisation de plate-formes de force intégrées au niveau du tapis roulant pourrait alors nous permettre de prendre des mesures à ce niveau

### **Paramètres optimaux et caractéristiques de la locomotion**

Nous avons déterminé les paramètres optimaux de la stimulation tonique et phasique pour évoquer la locomotion dans cette préparation. La stimulation tonique est la technique de stimulation la plus répandue car elle tente de mimer l'input des voies descendantes vers le générateur de patron central. Nos résultats concordent avec plusieurs études suggérant qu'une stimulation à basse intensité et à très basse fréquence (0.5 à 10 Hz dans la littérature) peut induire des rythmes locomoteurs (Iwahara et al, 1991b; Gerasimenko et al., 2005a; Shapkova, 2003; Marchetti et al, 2001b; Grillner et Zangger, 1979; Iwahara et al, 1991a). Que la fréquence soit si basse est intrigant, car la stimulation

de la MLR chez l'animal se situe plutôt autour de 30 Hz (Shik, 1966) et la stimulation épidurale efficace chez l'humain se situe approximativement entre 25 et 50 Hz (Dimitrijevic et al, 1998). Cependant chez les chats spinaux chroniques et les préparations de rats *in vitro*, une très basse fréquence semble être optimale. Il est possible qu'une si basse fréquence corresponde à un signal de la périphérie qui, après spinalisation, devient déterminant pour la locomotion.

La stimulation électrique par trains est peu ou pas utilisée dans la littérature. Cependant, nous avons pu entraîner le rythme locomoteur à une fréquence voulue avec ce type de stimulation, ce qui signifie que cette méthode permet de contrôler le rythme locomoteur. De même, l'intensité de la stimulation influence le patron locomoteur, similairement à la stimulation de la MLR. Cependant plusieurs séquences locomotrices n'ont pu être entraînées par la fréquence de stimulation et pouvait même se poursuivre après l'arrêt de la stimulation.

Les caractéristiques de la locomotion présentées ici sont similaires à celles mises en évidence par Shapkova et Schomburg (Shapkova et Schomburg, 2001) chez des patients paraplégiques. Ils ont en effet observé un premier type de locomotion, nommée 'marche locomotrice' (locomotor stepping) qui consiste en une activité bilatérale et alternée entre fléchisseurs et extenseurs et qui est indépendante de la fréquence de stimulation. Cette locomotion se poursuivait pendant un certain temps après l'arrêt de la stimulation. Le second type de locomotion, 'marche réflexogénique' est fortement lié à la fréquence de la stimulation et arrête en même temps que celle-ci. Ces deux types de locomotion reflèteraient l'implication du générateur spinal de locomotion.

Le gradient rostrocaudal des réponses d'extension évoquées par la stimulation de racines dorsales est similaire à celui évoqué par la stimulation intraspinale. Entre autres, les réponses d'extension sont surtout évoquées au niveau des segments lombaires caudaux, que ce soit par la stimulation intraspinale ou des racines dorsales. La stimulation des racines ventrales chez le chat semble aussi démontrer une progression rostrocaudale des mouvements évoqués par la stimulation des racines L5 à S1. Une stimulation des racines ventrales rostrales évoque des mouvements vers l'avant et vers le bas, alors qu'une stimulation des racines ventrales caudales induit des mouvements vers l'arrière et vers le bas (Aoyagi et al, 2004)

### **Importance des segments rostraux et des voies ventrales**

Nos résultats suggèrent aussi que les segments lombaires moyens L3 et L4, mais surtout L4, jouent un rôle crucial pour l'activation de la locomotion chez les chats spinaux. Les lésions des voies ventrales et ventrolatérales abolissent la locomotion évoquée par la stimulation électrique de segments plus caudaux. Conjointement aux résultats d'expériences chroniques et aiguës effectuées chez des chats spinaux dans le laboratoire du Dr Rossignol (Marcoux et Rossignol, 2000; Langlet et al, 2005), les conclusions de la présente étude tendent à confirmer le rôle prépondérant des segments lombaires pré-motoneuronaux dans la genèse de l'activité locomotrice. Quels sont les interneurones contenus dans ces segments et qui pourraient expliquer ces observations?

#### Interneurones impliqués

Les neurones propriospinaux de groupe II qui sont situés dans la zone intermédiaire/corne ventrale des segments L3, L4 et L5 pourraient être des cibles de la stimulation électrique. Ces interneurones reçoivent les projections des voies descendantes ainsi que les afférences périphériques du groupe II, principalement des muscles fléchisseurs de la hanche (Edgley et al, 1988). Ces neurones projettent dans le funicule ventrolatéral vers les noyaux moteurs des segments L4 à S1 et sont actifs pendant la locomotion induite par stimulation de la MLR (Shefchyk et al, 1990; Edgley et Jankowska, 1987a; Edgley et Jankowska, 1987b; Lundberg et al, 1987b; Lundberg et al, 1987c; Lundberg et al 1987a).

Un autre type d'interneurones, les interneurones commissuraux, dont un sous-groupe est situé dans la lamina VIII des segments L3 à L5 reçoivent des afférences des voies réticulo- et vestibulospinales ainsi que des afférences périphériques, notamment du groupe II (Krutki et al, 2003; Edgley et al, 2003b). Ils projettent aussi sur les noyaux moteurs des muscles controlatéraux. Basé sur leur localisation rostrale et sur leurs projections ventrales, ces deux groupes d'interneurones seraient centraux à l'initiation de la locomotion. La stimulation au niveau des segments caudaux activerait les neurones lombaires moyens par activation antidromique de leurs axones ou par l'activation des voies propriospinales ascendantes. En effet, une autre classe d'interneurones de groupe II est localisée au niveau des segments L6 et L7 (Riddell et Hadian, 2000). La moitié de ces

neurones projettent dans le funicule latéral ipsilatéral vers le segment L4, alors que d'autres interneurons contactent les noyaux moteurs directement.

L'implication proposée des interneurons commissuraux dans l'induction de la locomotion amène à se poser la question suivante : est-ce que les deux cotés de la moelle épinière sont nécessaires pour induire un patron locomoteur ? En d'autres mots, est-ce que chaque membre possède son unité génératrice de rythme ? Bien que la présence d'une activité locomotrice restreinte à la patte ipsilatérale soit observée dans cette étude, nous ne pouvons pas conclure sur cet aspect. Il a cependant été démontré qu'un rythme locomoteur pouvait n'être observé que dans un seul membre postérieur (Grillner et Rossignol, 1978). De plus, des évidences récentes chez la lamproie indiquent qu'un rythme moteur unilatéral peut être évoqué suite à une lésion de la moelle épinière le long de la ligne médiane (Cangiano et Grillner, 2003).

#### Segments L3-L4 : éléments du CPG?

Étant donné l'importance des segments lombaires moyens L3-L4 dans la locomotion induite par la stimulation électrique, ainsi que la présence dans ces segments de neurones ayant un impact important sur la locomotion (interneurones commissuraux et de groupe II), nous pouvons nous demander quel rôle peuvent bien jouer ces segments dans la locomotion. En d'autres termes, quelle partie du générateur de patron central est lésée ou interrompue par des lésions au segment L3 et L4?

Il est peu probable que les lésions rostrales à caudal L4 atteignent les motoneurones innervant les muscles des membres postérieurs, car les motoneurones situés le plus rostralement dans le renflement lombo-sacré, ceux innervant les muscles fléchisseurs de la hanche, ne sont pas présents à ces niveaux (Figure 3; Vanderhorst et Holstege, 1997). Cependant, de telles lésions pourraient détruire une partie de l'unité génératrice de rythme au niveau des fléchisseurs de la hanche, tel que décrit dans le modèle de Grillner. Étant donné que l'alternance entre la flexion et l'extension de la hanche est déterminante pour la locomotion, une telle destruction pourrait empêcher l'induction de la locomotion bilatérale.

Une autre possibilité serait que les éléments situés au niveau de L3-L4 mettent en œuvre, un peu comme un chef d'orchestre, les éléments nécessaires à l'induction de la

locomotion situés dans les segments caudaux et permettent ainsi l'initiation du rythme locomoteur. Ces éléments détermineraient le début de la locomotion et seraient également activés de manière directe par la stimulation dans les séquences d'entraînement de la locomotion. Ces éléments pourraient donc changer le rythme (timing) de la locomotion et permettraient une réinitiation du cycle locomoteur. Cette dernière hypothèse serait en ligne avec la théorie de générateur central bipartite énoncée par plusieurs chercheurs (Lafrenière-Roula et McCrea, 2005; Burke, 2001; Lennard, 1985) où deux générateurs coexisteraient et pourraient même se recouper, soit le générateur de patron musculaire et le générateur de rythme locomoteur. Bien que nous ayons observé des changements de patron musculaire sans changement de rythme locomoteur, nous n'avons pas observé de changement de rythme locomoteur sans changements de patron musculaire (voir article 2, Figure 6).

Cependant l'un des patrons d'induction de la locomotion commence par une alternance controlatérale, souvent accompagnée de décharges rythmiques locomotrices dans les fléchisseurs ipsilatéraux (c.f. article 2, Figure 3A). Le début des bouffées dans les extenseurs du membre ipsilatéral déclenche une séquence de locomotion bilatérale. De temps à autre, la décharge dans les extenseurs ipsilatéraux arrête et la locomotion bilatérale est remplacée par une séquence de locomotion contralatérale. Une augmentation de l'intensité ou un mouvement léger d'électrode redéclenchera une locomotion bilatérale. Ce phénomène pourrait s'apparenter au phénomène d'absence décrit par Lafrenière-Roula et McCrea (2005). Cependant ces 'absences' sont sûrement dues à des artefacts reliés à notre préparation et au moyen utilisé pour induire la locomotion qui n'est pas optimal.

En définitive, les segments L3-L4 possèdent probablement des composantes importantes du CPG mais la nature de ces composantes ne peut être déterminée par la présente étude.

## **Perspectives Cliniques**

Il est donc possible d'induire la locomotion à l'aide de stimulation intraspinale, ou de stimulation des racines dorsales, combinée à une injection de clonidine. La locomotion peut aussi être évoquée de manière plus régulière chez un chat ayant récupéré la marche sur tapis roulant. Comparé à d'autres approches de stimulation intraspinale, la stimulation

électrique appliquée via une électrode possède un certain nombre d'avantages. D'abord, la stimulation simultanée de différents sites de la moelle épinière n'est pas nécessaire à la production de la locomotion comme le suggèrent différentes études (Saigal et al, 2004; Tai et al, 2003a; Lemay et Grill, 2004b). Ainsi, dans l'éventualité d'implants chroniques, la taille de l'implant pourrait être réduite à quelques électrodes, chacune pouvant induire le patron locomoteur complet. Les dommages à la moelle épinière seraient donc restreints. De plus, l'intensité de la stimulation nécessaire pour évoquer la marche est faible et constitue un autre avantage non négligeable de cette technique.

La stimulation tonique et par train sont efficaces pour induire la locomotion. La stimulation tonique s'intègre plus facilement à l'épisode de locomotion en cours et est moins 'dérangante'. Cependant les effets bénéfiques de la stimulation par train ne doivent pas être sous-estimés. On pourrait penser que grâce à l'entraînement possible du rythme locomoteur avec la stimulation par train, on puisse coordonner les mouvements des pattes postérieures et antérieures du chat en se synchronisant, par exemple, sur un signal EMG des membres antérieurs.

La stimulation électrique pourrait être combinée à un agent pharmacologique. L'injection de clonidine i.t. chez des patients lésés s'est avérée bénéfique pour diminuer les signes de spasticité, mais bien qu'elle ait permis une augmentation de la vitesse de marche chez quelques sujets, l'effet n'était pas aussi impressionnant que celui observé chez le chat (Remy-Neris et al, 1999). La combinaison de la stimulation électrique et de l'injection de clonidine chez ces patients pourrait améliorer de façon importante leurs habiletés locomotrices. De même l'entraînement locomoteur sur tapis roulant serait un parfait complément thérapeutique (Carhart et al, 2004; Dietz et Harkema, 2004; Fung et al, 1990). En somme, il serait envisageable qu'une approche similaire à celle décrite ici, combinant stimulation électrique intraspinale, injection de clonidine et entraînement locomoteur puisse être adaptée pour des patients ayant subi une lésion de la moelle épinière.

### **Expériences chroniques**

Une prochaine étape vers l'utilisation de cette technique en clinique serait d'utiliser cette approche chez des chats spinaux chroniques. J'ai effectué un stage dans le laboratoire du Dr V. Mushahwar à Edmonton, où nous avons utilisé une matrice d'électrodes

implantées chroniquement chez les chats spinaux pour induire la locomotion. Chaque microélectrode mesure 30  $\mu\text{m}$  de diamètre et peut être aisément insérée dans la moelle. L'implant était placé au niveau des segments L3 et L4 et les électrodes visaient la région intermédiaire de la moelle épinière, soit 2 à 3 mm sous la surface dorsale. La Figure 9 montre une de ces matrices après 3 mois d'expérience. Sur cette figure, la colonne vertébrale n'a été retirée que partiellement et on peut voir le point d'ancrage de la matrice au niveau de la vertèbre L2. Le but de cette étude visait à répondre à la question suivante: la stimulation électrique de la moelle épinière peut-elle activer de manière chronique des séquences locomotrices? Les résultats préliminaires que nous avons obtenus tendent à montrer que c'est le cas.

Plus précisément, nous avons démontré que la stimulation de la zone intermédiaire des segments pré-motoneuronaux L3-L4 était efficace pour déclencher la locomotion chez des chats spinaux (T11) entraînés, lorsque la clonidine était utilisée (Figure 10; Barthélemy et al, 2004a,b). Des rythmes bilatéraux et alternés de plus faible amplitude ont également pu être évoqués sans ajout de clonidine. Ces résultats indiquent bien qu'il est effectivement possible d'évoquer une locomotion avec support de poids chez des chats spinaux (T11) chroniquement implantés sur une période de plusieurs mois. D'autre part ces résultats viennent confirmer l'efficacité des segments lombaires L3-L4 à évoquer un patron locomoteur chez le chat spinal.

Malgré ces résultats positifs, plusieurs questions quant à l'utilisation thérapeutique des stimulations électriques ont fait surface. Notamment, la stimulation n'a pu évoquer de séquences locomotrices avant le 1<sup>er</sup> (n=1) et le 2<sup>e</sup> (n=2) mois post-spinalisation, y compris en présence de clonidine. De plus, la stabilité de l'implant n'était pas acquise. La technique doit donc être améliorée et, à cet égard, plusieurs études y sont consacrées (Snow et al 2006a,b). De même, l'expertise développée dans l'implantation chronique d'électrodes au niveau du cortex moteur chez le singe pourrait être bénéfique et aider à l'amélioration de ce procédé dans la moelle épinière (Donoghue, 2002; Schwartz, 2004).

### **Stimulation intraspinale vs autres approches neuroprosthétiques**

La stimulation intraspinale de la moelle épinière a des avantages certains comparativement à la stimulation neuromusculaire périphérique. Dans cette dernière

approche, la stimulation de multiples électrodes de surface ou sous-cutanées doit être utilisée pour assurer une activation adéquate des différents groupes musculaires dans une séquence d'activation appropriée.

Cependant, de nouvelles approches minimisant le nombre d'électrodes requis émergent. Notamment, la stimulation des dermatomes L3-L4 pendant la locomotion sur tapis roulant donnerait des résultats bénéfiques chez les patients ayant une lésion incomplète (Bajd et al, 2002). Cette stimulation facilite la flexion de la jambe au cours de la phase de balancement. Ainsi, une assistance minime de la stimulation électrique est fournie uniquement au moment opportun (Cikajlo et al., 2003)

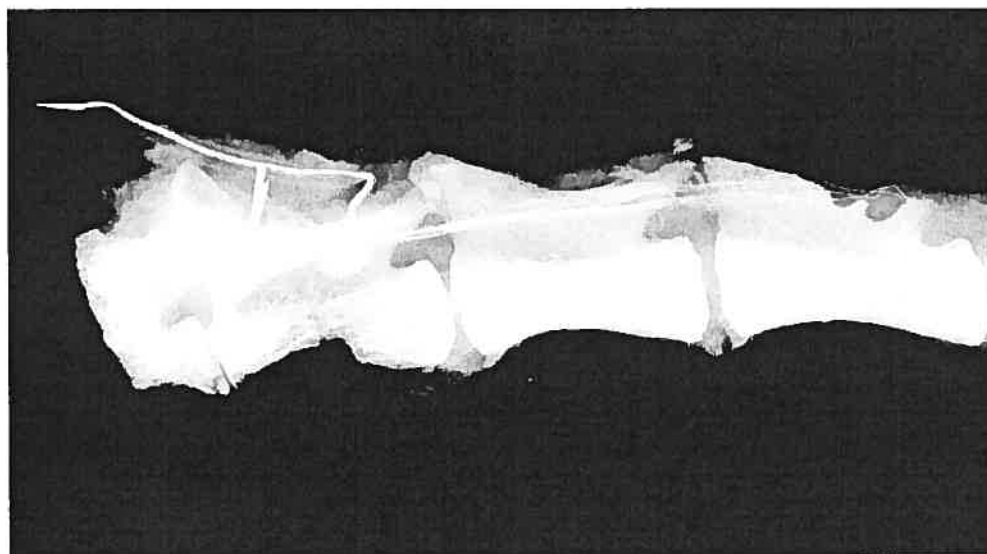
### **Stimulation épidurale**

Présentement la stimulation épidurale de la moelle épinière est utilisée chez des patients ayant une lésion de la moelle épinière. Cette technique moins invasive que la stimulation intraspinale semble très bénéfique.

Des études ont démontrées l'efficacité d'une stimulation épidurale combinée à un entraînement locomoteur sur tapis roulant chez des patients ayant une lésion incomplète de la moelle épinière (Carhart et al, 2004; Herman et al, 2002). L'addition de la stimulation épidurale diminuerait de manière importante la sensation d'effort rapportée par les patients pendant la marche sur le terrain plat et augmenterait la vitesse de marche.

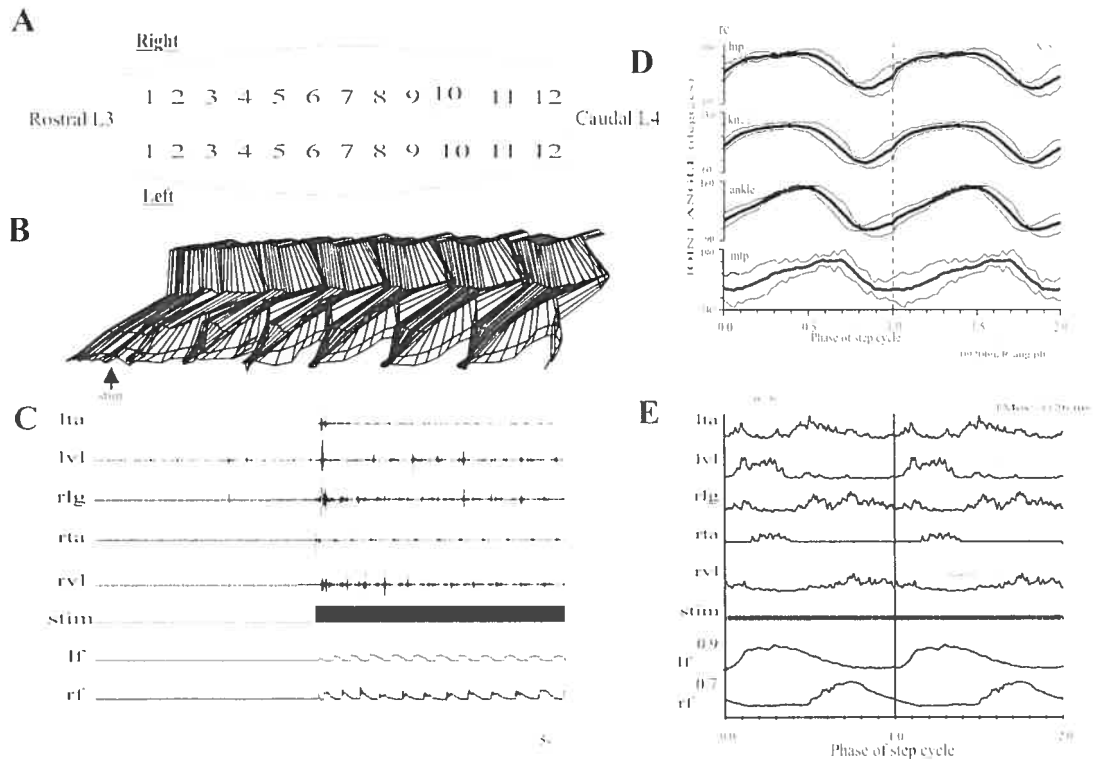
De même, l'efficacité d'un entraînement locomoteur accompagné d'une stimulation épidurale ou de la surface dorsale de la moelle épinière a été étudiée chez des enfants ayant une myélopathie d'origine vertébrale provoquant une lésion fonctionnelle complète de la moelle épinière. Les résultats suggèrent que les stimulations électriques n'auraient pas seulement un effet restreint au niveau segmentaire (Shapkova, 2003). En effet, l'amélioration de la sensibilité et les progrès dans les habiletés locomotrices de patients ayant une lésion considérée comme complète 'fonctionnelle' suggère un effet de la stimulation électrique sur les voies spinales ascendantes et descendantes restantes.





**Figure 9- Matrice d'électrodes implantées**

Radiographie *in situ* d'une matrice d'électrodes implantées 5 mois auparavant au niveau des segments spinaux L3-L4 d'un chat. Sur cette radiographie, la moelle épinière est présente dans le canal vertébral. À gauche, on peut voir le point d'ancrage de la matrice au niveau de la vertèbre L2.



**Figure 10-Locomotion avec support de poids induit par stimulation électrique chez un chat avec clonidine, un mois après spinalisation.**

Une stimulation électrique appliquée à l'électrode numéro 10 à droite et numéro 12 à gauche de la moelle induit la locomotion (A). Le diagramme des pattes (B) ainsi que les enregistrements EMG (B), montrent que ce chat ne marchait pas sur le tapis roulant avant que la stimulation électrique ne soit appliquée. Les moyennages d'excursions angulaires (D) montrent que le mouvement survient à toutes les articulations du membre au cours de la locomotion. Les moyennages EMG montrent une bonne alternance entre les fléchisseurs et les extenseurs de chaque membre, ainsi qu'entre les deux membres. L'extension au cours de la phase d'appui est assez grande pour supporter le poids (0.9 kg et 0.7 kg pour la patte gauche et droite respectivement). La stimulation tonique est appliquée à 50 Hz. Intensité pour électrode 10R : 1.3 x seuil moteur (253  $\mu$ A). Intensité pour l'électrode 12L : 2.1 x seuil moteur (100  $\mu$ A).

### **Stimulation des racines dorsales**

Les stimulations épidurale et intraspinale activeraient les racines dorsales pour induire la locomotion. La stimulation directe des racines dorsale s'est aussi avérée efficace pour déclencher la locomotion dans notre préparation, confirmant les données de la littérature à cet égard (Grillner et Zangger, 1979; Marchetti et al 2001a). On pourrait donc proposer cette technique comme approche thérapeutique en clinique. Elle est moins invasive que la stimulation intraspinale, car les racines dorsales sont accessibles à leur sortie du canal vertébral. D'ailleurs, la stimulation percutanée des racines dorsales est déjà utilisée pour étudier la modulation des réflexes au cours de la locomotion (Dy et al, 2005). La stimulation des racines ventrales a également été testée chez les patients paraplégiques dans le but d'évoquer des mouvements d'extension des jambes. Les mouvements évoqués se sont avérés utiles pour la station debout et lors de mouvement de cyclisme, mais pas pour la locomotion (Rushton et al., 1997). Une modification de cette approche pourrait aussi être développée pour tenter d'évoquer la locomotion chez des patients paraplégiques. Cependant la stimulation de racines dorsales peut activer des réflexes autonomes et produire des changements importants de pression artérielle (Ashley et al., 1993), ce qui pourrait être un frein potentiel à son utilisation.

### **Autres utilisations de la stimulation électrique en clinique**

Plusieurs études ont aussi montré l'importance de la stimulation électrique pour pallier à d'autres conditions associées aux lésions de la moelle épinière, notamment dans le traitement de douleur d'origine spinale (North et Wetzel, 2002; Barolat, 2000). Aussi, une stimulation épidurale dans les segments lombaires rostraux L1-L3, les mêmes segments permettant de déclencher un patron locomoteur chez les patients, mais à une fréquence plus élevée (50 à 100 Hz) diminue la spasticité observée chez ces patients paraplégiques (Pinter et al, 2000). Une stimulation au même niveau lombaire entre 5 et 10 Hz peut initier et maintenir l'extension des membres inférieurs chez des patients paraplégiques de longue durée c'est-à-dire au moins un an après la lésion (Jilge et al., 2004). Une telle stimulation est utilisée pour faciliter la prise et le maintien de la station debout de même que les transferts fonctionnels des patients.

Enfin, la stimulation intraspinale des segments sacrés est utilisé pour tenter de diminuer les dysfonction du système urinaire et des progrès importants ont été réalisés dans ce domaine (Tai et al, 2004; Gaunt et Prochazka, 2006; Jezernik et al, 2002).

## Conclusion

En conclusion, la stimulation électrique intraspinale à l'aide d'une seule électrode est efficace pour induire la locomotion. Elle constitue une technique prometteuse pour permettre la récupération de la locomotion après une lésion de la moelle épinière. La cartographie des réponses non-locomotrices et locomotrices évoquées par la stimulation devrait nous guider dans l'amélioration et l'élaboration de nouvelles stratégies thérapeutiques, s'appuyant entre autres sur l'utilisation d'implants chronique. La stimulation électrique utiliserait les voies dorsales et les afférences sensorielles pour induire la locomotion, mais l'intégrité du funicule ventral et ventrolatéral, et des segments L3-L4 sont essentielles pour induire la locomotion par stimulation intraspinale ou de racines dorsale des segments L5 à S1.

Dans une perspective clinique, ces résultats sont encourageants pour une éventuelle utilisation de la stimulation électrique intraspinale ou des racines dorsales pour aider à la récupération de la locomotion, après lésions de la moelle épinière. Cependant, les étapes nécessaires pour bien documenter cette technique ne doivent pas être sautées ou accélérées et plusieurs études sont encore nécessaires pour déterminer la fiabilité, la stabilité et la sécurité de cette approche.

## CHAPITRE V - BIBLIOGRAPHIE

---

Amos, A., Armstrong, D. M., et Marple-Horvat, D. E. (1990). Changes in the discharge patterns of motor cortical neurones associated with volitional changes in stepping in the cat. *Neurosci.Lett.*, 109, 107-112.

Anden, N. E., Jukes, M. G. M., Lundberg, A., et Vyklicky, L. (1966). The effect of DOPA on the spinal cord. 1. Influence on transmission from primary afferents. *Acta Physiol Scand.*, 67, 373-386.

Andersson, O. et Grillner, S. (1983). Peripheral control of the cat's step cycle. II. Entrainment of the central pattern generators for locomotion by sinusoidal hip movements during "fictive locomotion". *Acta Physiol Scand.*, 118, 229-239.

Aoyagi, Y., Mushahwar, V. K., Stein, R. B., et Prochazka, A. (2004). Movements elicited by electrical stimulation of muscles, nerves, intermediate spinal cord, and spinal roots in anesthetized and decerebrate cats. *IEEE Trans.Neural Syst.Rehabil.Eng*, 12, 1-11.

Armstrong, D. M. (1986). Supraspinal contributions to the initiation and control of locomotion in the cat. *Prog.Neurobiol.*, 26, 273-361.

Armstrong, D. M. (1988). The supraspinal control of mammalian locomotion. *Journal of Physiology*, 405, 1-37.

Armstrong, D. M. et Drew, T. (1984). Locomotor-related neuronal discharges in cat motor cortex compared with peripheral receptive fields and evoked movements. *Journal of Physiology*, 346, 497-517.

Ashley, E. A., Laskin, J. J., Olenik, L. M., Burnham, R., Steadward, R. D., Cumming, D. C., et Wheeler, G. D. (1993). Evidence of autonomic dysreflexia during functional electrical stimulation in individuals with spinal cord injuries. *Paraplegia*, 31, 593-605.

Baev, K. V. et Kostyuk, P. G. (1982). Polarization of primary afferent terminals of lumbosacral cord elicited by the activity of spinal locomotor generator. *Neurosci.*, 7, 1401-1409.

Bagshaw, E. V. et Evans, M. H. (1976). Measurement of current spread from microelectrodes when stimulating within the nervous system. *Experimental Brain Research*, 25, 391-400.

Bajd, T., Muni, M., Savrin, R., Benko, H., et Cikajlo, I. (2002). Dermatome electrical stimulation as a therapeutic ambulatory aid for incomplete spinal cord injured patients. *Artif.Organs*, 26, 260-262.

Baldissera, F., Hultborn, H., et Illert, M. (1981). Integration in spinal neuronal systems. Dans J.M.Brookhart et V. B. Mountcastle (Eds.), *Handbook of physiology* (pp. 509-595). Maryland: Amer.Physiol.Soc.

Barbeau, H., Chau, C., et Rossignol, S. (1993). Noradrenergic agonists and locomotor training affect locomotor recovery after cord transection in adult cats. *Brain Res.Bull.*, 30, 387-393.

Barbeau, H., Julien, C., et Rossignol, S. (1987). The effects of clonidine and yohimbine on locomotion and cutaneous reflexes in the adult chronic spinal cat. *Brain Research*, 437, 83-96.

Barbeau, H., Ladouceur, M., Norman, K. E., Pepin, A., et Leroux, A. (1999). Walking after spinal cord injury: evaluation, treatment, and functional recovery. *Arch Phys Med Rehabil*, 80, 225-235.

Barbeau, H. et Rossignol, S. (1987). Recovery of locomotion after chronic spinalization in the adult cat. *Brain Research*, 412, 84-95.

Barbeau, H. et Rossignol, S. (1990). The effects of serotonergic drugs on the locomotor pattern and on cutaneous reflexes of the adult chronic spinal cat. *Brain Research*, 514, 55-67.

Barbeau, H. et Rossignol, S. (1991). Initiation and modulation of the locomotor pattern in the adult chronic spinal cat by noradrenergic, serotonergic and dopaminergic drugs. *Brain Research*, 546, 250-260.

Barolat, G. (2000). Spinal cord stimulation for chronic pain management. *Archives of Medical Research*, 31, 258-62.

Barthélemy, D., Rossignol, S., and Mushahwar V.K. (2004a). Intraspinal microstimulation in segments L3-L4 of chronic spinal cats can induce locomotion. *Soc. Neurosci Abstr.*, 34, 883.16.

Barthélemy, D., Rossignol, S., and Mushahwar, V. (2004b). Intraspinal electrical stimulation in L3-L4 segments of chronic spinal cats may induce bilateral and alternate rhythmic hindlimb movements.

. *Canadian Physiological Society*, Jan 2004.

Bedard, P. J., Tremblay, L. E., Barbeau, H., Filion, M., Maheux, R., Richards, C. L., et Dipaolo, T. (1987). Action of 5-hydroxytryptamine, substance P, thyrotropin-releasing hormone and clonidine on motoneurone excitability. *Canadian journal of neurological sciences*, 14, 506-509.

Bélanger, M., Drew, T., Provencher, J., et Rossignol, S. (1996). A comparison of treadmill locomotion in adult cats before and after spinal transection. *Journal of Neurophysiology*, 76, 471-491.

Bélanger, M., Drew, T., and Rossignol, S. (1988). A comparative study of the response to mechanical perturbations during locomotion in the same chronically implanted cats before and after spinalisation. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 66, AV.

Bélanger, M. et Patla, A. E. (1987). Phase-dependent compensatory responses to perturbation applied during walking in humans. *Journal of motor behavior*, 19, 434-453.

Beloozerova, I. N. et Sirota, M. G. (1993). The role of the motor cortex in the control of accuracy of locomotor movements in the cat. *Journal of Physiology*, 461, 1-25.



Bem, T., Gorska, T., Majczynski, H., et Zmyslowski, W. (1995). Different patterns of fore-hindlimb coordination during overground locomotion in cats with ventral and lateral spinal lesions. *Experimental Brain Research*, 104, 70-80.

Berkinblit, M. B., Deliagina, T. G., Feldman, A. G., Gelfand, I. M., et Orlovsky, G. N. (1978). Generation of scratching. II. Nonregular regimes of generation. *Journal of Neurophysiology*, 41, 1058-1069.

Bizzi, E. et Clarac, F. (1999). Motor systems. *Curr.Opin.Neurobiol.*, 9, 659-662.

Bizzi, E., Mussa-Ivaldi, F. A., et Giszter, S. (1991). Computations underlying the execution of movement: a biological perspective. *Science*, 253, 287-291.

Bouyer, L. J. G., Whelan, P., Pearson, K. G., et Rossignol, S. (2001). Adaptive locomotor plasticity in chronic spinal cats after ankle extensors neurectomy. *Journal of Neuroscience*, 21, 3531-3541

Bouyer, L. J. G. et Rossignol, S. (2003a). Contribution of cutaneous inputs from the hindpaw to the control of locomotion: 1. Intact cats. *Journal of Neurophysiology*, 90, 3625-3639.

Bouyer, L. J. G. et Rossignol, S. (2003b). Contribution of cutaneous inputs from the hindpaw to the control of locomotion: 2. Spinal cats. *Journal of Neurophysiology*, 90, 3640-3653.

Bras, H., Cavallari, P., Jankowska, E., et Kubin, L. (1989). Morphology of midlumbar interneurons relaying information from group II muscle afferents in the cat spinal cord. *Journal of Comparative Neurology*, 290, 1-15.

Bras, H., Jankowska, E., Noga, B., et Skoog, B. (1990). Comparison of effects of various types of NA and 5-HT agonists on transmission from group II muscle afferents in the cat. *Eur.J.Neurosci.*, 211, 1029-1039.

Bregman, B. S. et Goldberger, M. E. (1983). Infant lesion effect: I. Development of motor behavior following neonatal spinal cord damage in cats. *Developmental Brain Research*, 9, 103-117.

Brodal, A. (1981). *Neurological anatomy*. (2 ed.) London: Oxford Univ. Press.

Brodin, L. et Grillner, S. (1985). The role of putative excitatory amino acid neurotransmitters in the initiation of locomotion in the lamprey spinal cord. I. The effects of excitatory amino acid antagonists. *Brain Research*, 360, 139-148.

Brodin, L., Grillner, S., et Rovainen, C. M. (1985). N-methyl-D-aspartate (NMDA), kainate and quisqualate receptors and the generation of fictive locomotion in the lamprey spinal cord. *Brain Research*, 325, 302-306.

Brown, T. G. (1911). The intrinsic factors in the act of progression in the mammal. *Proc.Roy.Soc.London B.*, 84, 308-319.

Brown, T. G. (1914). On the nature of the fundamental activity of the nervous centres together with an analysis of the conditioning of rhythmic activity in progression and a theory of the evolution of function in the nervous system. *Journal of Physiology*, 48, 18-46.

Brustein, E. et Rossignol, S. (1998). Recovery of locomotion after ventral and ventrolateral spinal lesions in the cat. I. Deficits and adaptive mechanisms. *Journal of Neurophysiology*, 80, 1245-1267.

Brustein, E. et Rossignol, S. (1999). Recovery of locomotion after ventral and ventrolateral spinal lesions in the cat. II. Effects of noradrenergic and serotonergic drugs. *Journal of Neurophysiology*, 81, 1513-1530.

Budakova, N. N. (1971). Stepping movements evoked in a mesencephalic cat by a rhythmic stimulation of a dorsal root in mesencephalic cat. *Sechenov Physiol.J.of USSR.*, 57, 1632-1640.

Bunge, M. B. et Pearse, D. D. (2003). Transplantation strategies to promote repair of the injured spinal cord. *J.Rehabil.Res.Dev.*, 40, 55-62.

- Burke, R. E., Degtyarenko, A. M., et Simon, E. S. (2001). Patterns of locomotor drive to motoneurons and last-order interneurons: Clues to the structure of the CPG. *Journal of Neurophysiology*, 86, 447-462.
- Butt, S. J., Harris-Warrick, R. M., et Kiehn, O. (2002). Firing properties of identified interneuron populations in the mammalian hindlimb central pattern generator. *Journal of Neuroscience*, 22, 9961-9971.
- Butt, S. J. et Kiehn, O. (2003). Functional identification of interneurons responsible for left-right coordination of hindlimbs in mammals. *Neuron*, 38, 953-963.
- Calancie, B., Alexeeva, N., Broton, J. G., Suys, S., Hall, A., et Klose, K. J. (1999). Distribution and latency of muscle responses to transcranial magnetic stimulation of motor cortex after spinal cord injury in humans. *J.Neurotrauma*, 16, 49-67.
- Calancie, B., Needham-Shropshire, B., Jacobs, P., Willer, K., Zych, G., et Green, B. A. (1994). Involuntary stepping after chronic spinal cord injury. Evidence for a central rhythm generator for locomotion in man. *Brain*, 117, 1143-1159.
- Cangiano, L. et Grillner, S. (2003). Fast and slow locomotor burst generation in the hemispinal cord of the lamprey. *Journal of Neurophysiology*, 89, 2931-2942.
- Carhart, M. R., He, J., Herman, R., D'Luzansky, S., et Willis, W. T. (2004). Epidural spinal-cord stimulation facilitates recovery of functional walking following incomplete spinal-cord injury. *IEEE Trans.Neural Syst.Rehabil.Eng*, 12, 32-42.
- Carlson-Kuhta, P., Trank, T. V., et Smith, J. L. (1998). Forms of forward quadrupedal locomotion. II. A comparison of posture, hindlimb kinematics, and motor patterns for upslope and level walking. *J.Neurophysiol.*, 79, 1687-1701.
- Carrier, L., Brustein, L., et Rossignol, S. (1997). Locomotion of the hindlimbs after neurectomy of ankle flexors in intact and spinal cats: model for the study of locomotor plasticity. *Journal of Neurophysiology*, 77, 1979-1993.

Carter, M. C. & Smith, J. L. (1986a). Simultaneous control of two rhythmical behaviors. I. Locomotion with paw-shake response in normal cat. *Journal of Neurophysiology*, 56, 171-183.

Carter, M. C. & Smith, J. L. (1986b). Simultaneous control of two rhythmical behaviors. II. Hindlimb walking with paw-shake response in spinal cat. *Journal of Neurophysiology*, 56, 184-195.

Cavallari, P., Edgley, S. A., et Jankowska, E. (1987). Post-synaptic actions of midlumbar interneurons on motoneurons of hind-limb muscles in the cat. *Journal of Physiology*, 389, 675-689.

Cazalets, J. R. (2000). Organization of the spinal locomotor network in neonatal rat. Dans R.G.Kalb et S. M. Strittmater (Eds.), *Neurobiology of spinal cord injury* (pp. 89-111). Totowa N.J.: Humana Press.

Cazalets, J. R., Borde, M., et Clarac, F. (1995). Localization and organization of the central pattern generator for hindlimb locomotion in newborn rat. *Journal of Neuroscience*, 15, 4943-4951.

Cazalets, J. R., Sqalli-Houssaini, Y., et Clarac, F. (1992). Activation of the central pattern generators for locomotion by serotonin and excitatory amino acids in neonatal rat. *Journal of Physiology*, 455, 187-204.

Chambers, W. W. et Liu, C. N. (1957). Corticospinal tract of the cat: an attempt to correlate the pattern of degeneration with deficits in reflex activity following neocortical lesions. *J.Comp Neurol.*, 108, 23-55.

Chapin, J. K., Moxon, K. A., Markowitz, R. S., et Nicolelis, M. A. (1999). Real-time control of a robot arm using simultaneously recorded neurons in the motor cortex. *Nat.Neurosci*, 2, 664-670.

Chau, C., Barbeau, H., et Rossignol, S. (1998a). Early locomotor training with clonidine in spinal cats. *Journal of Neurophysiology*, 79, 392-409.

- Chau, C., Barbeau, H., et Rossignol, S. (1998b). Effects of intrathecal  $\alpha_1$ - and  $\alpha_2$ -noradrenergic agonists and norepinephrine on locomotion in chronic spinal cats. *Journal of Neurophysiology*, 79, 2941-2963.
- Chau, C., Giroux, N., Reader, T. A., and Rossignol, S. (2001). Ampa and alpha-2 adrenergic receptors in cat lumbo-sacral spinal cord following complete lesions. *Society for Neuroscience Abstracts*, 27.
- Chau, C., Provencher, J., Lebel, F., Jordan, L., Barbeau, H., and Rossignol, S. (1994). Effects of intrathecal injection of NMDA receptor agonist and antagonist on locomotion of adult chronic spinal cats. *Society for Neuroscience Abstracts*, 20, 573, no 214.14.
- Chu, N. et Bloom, F. E. (1973). Norepinephrine-containing neurons: changes in spontaneous discharge patterns during sleeping and waking. *Science*, 179, 908-910.
- Cikajlo, I., Matjacic, Z., et Bajd, T. (2003). Development of a gait re-education system in incomplete spinal cord injury. *J.Rehabil.Med.*, 35, 213-216.
- Coburn, B. (1985). A theoretical study of epidural electrical stimulation of the spinal cord--Part II: Effects on long myelinated fibers. *IEEE Trans.Biomed.Eng.*, 32, 978-986.
- Cohen, A. H., Ermentrout, G. B., Kiemel, T., Kopell, N., Sigvardt, K. A., et Williams, T. L. (1992). Modelling of intersegmental coordination in the lamprey central pattern generator for locomotion. *Trends Neurosci.*, 15, 434-438.
- Conway, B. A., Hultborn, H., et Kiehn, O. (1987). Proprioceptive input resets central locomotor rhythm in the spinal cat. *Experimental Brain Research*, 68, 643-656.
- Cote, M. P. et Gossard, J. P. (2004). Step training-dependent plasticity in spinal cutaneous pathways. *J Neurosci*, 24, 11317-11327.
- Cote, M. P., Menard, A., et Gossard, J. P. (2003). Spinal cats on the treadmill: changes in load pathways. *J Neurosci*, 23, 2789-2796.

Cowley, K. C. et Schmidt, B. J. (1994). A comparison of motor patterns induced by N-methyl-D-aspartate, acetylcholine and serotonin in the in vitro neonatal rat spinal cord. *Neurosci.Lett.*, 171, 147-150.

Dai, X., Noga, B. R., Douglas, J. R., et Jordan, L. M. (2005). Localization of spinal neurons activated during locomotion using the c-fos immunohistochemical method. *Journal of Neurophysiology*, 93, 3442-3452.

de Leon, R. D., London, N. J., Roy, R. R., et Edgerton, V. R. (1999). Failure analysis of stepping in adult spinal cats. *Prog.Brain Res.*, 123, 341-348.

de Leon, R. D., Tamaki, H., Hodgson, J. A., Roy, R. R., et Edgerton, V. R. (1999). Hindlimb locomotor and postural training modulates glycinergic inhibition in the spinal cord of the adult spinal cat. *Journal of Neurophysiology*, 82, 359-369.

Degtyarenko, A. M., Zavadskaya, T. V., et Baev, K. V. (1993). Mechanisms of supraspinal correction of locomotor activity generator. *Neurosci.*, 52, 323-332.

Deliagina, T. G., Feldman, A. G., Gelfand, I. M., et Orlovsky, G. N. (1975). On the role of central program and afferent inflow in the control of scratching movements in the cat. *Brain Research*, 100, 297-313.

Deliagina, T. G., Orlovsky, G. N., et Pavlova, G. A. (1983). The capacity for generation of rhythmic oscillations is distributed in the lumbosacral spinal cord of the cat. *Experimental Brain Research*, 53, 81-90.

Dietz, V., Colombo, G., Jensen, L., et Baumgartner, L. (1995). Locomotor capacity of spinal cord in paraplegic patients. *Ann.Neurol.*, 37, 574-582.

Dietz, V. et Harkema, S. J. (2004). Locomotor activity in spinal cord-injured persons. *J Appl.Physiol*, 96, 1954-1960.

Dietz, V., Quintern, J., Boos, G., et Berger, W. (1986). Obstruction of the swing phase during gait: phase-dependent bilateral leg muscle coordination. *Brain Research*, 384, 166-169.

Dimitrijevic, M. R., Gerasimenko, Y., et Pinter, M. M. (1998). Evidence for a spinal central pattern generator in humans. *Ann.N.Y.Acad.Sci.*, 860, 360-376.

Donoghue, J. P. (2002). Connecting cortex to machines: recent advances in brain interfaces. *Nat.Neurosci.*, 5 Suppl, 1085-1088.

Douglas, J. R., Noga, B. R., Dai, X., et Jordan, L. M. (1993). The effects of intrathecal administration of excitatory amino acid agonists and antagonists on the initiation of locomotion in the adult cat. *Journal of Neuroscience*, 13, 990-1000.

Drew, T. (1991). Functional organization within the medullary reticular formation of the intact unanesthetized cat.III.Microstimulation during locomotion. *Journal of Neurophysiology*, 66, 919-938.

Drew, T. (1993). Motor cortical activity during voluntary gait modifications in the cat.I. Cells related to the forelimbs. *Journal of Neurophysiology*, 70, 179-199.

Drew, T., Dubuc, R., et Rossignol, S. (1986). Discharge patterns of reticulospinal and other reticular neurons in chronic, unrestrained cats walking on a treadmill. *Journal of Neurophysiology*, 55, 375-401.

Drew, T., Jiang, W., Kably, B., et Lavoie, S. (1996). Role of the motor cortex in the control of visually triggered gait modifications. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 74, 426-442.

Drew, T., Prentice, S., et Schepens, B. (2004). Cortical and brainstem control of locomotion. *Prog.Brain Res.*, 143, 251-261.

Drew, T. et Rossignol, S. (1984). Phase-dependent responses evoked in limb muscles by stimulation of medullary reticular formation during locomotion in thalamic cats. *Journal of Neurophysiology*, 52, 653-675.

Drew, T. and Rossignol, S. (1988). Segmental and suprasegmental effect on the locomotor rhythm in intact cats. *Society for Neuroscience Abstracts*, 14, 265.

Duysens, J., Clarac, F., et Cruse, H. (2000). Load-regulating mechanisms in gait and posture: comparative aspects. *Physiol Rev.*, 80, 83-133.

Duysens, J. et Loeb, G. E. (1980). Modulation of ipsi-and contralateral reflex responses in unrestrained walking cats. *Journal of Neurophysiology*, 44, 1024-1037.

Duysens, J. et Pearson, K. G. (1980). Inhibition of flexor burst generation by loading ankle extensor muscles in walking cats. *Brain Research*, 187, 321-332.

Dy C.J., Dyhre-Poulsen P., Courtine G, Gerasimenko Y.P., et Harkema S.J. modulation of multisegmental monosynaptic responses during walking in spinal cord-injured humans. Society for Neuroscience, Washington . 2005.

Eccles, J. C., Eccles, R. M., Iggo, A., et Lundberg, A. (1961). Electrophysiological investigations on Renshaw cells. *Journal of Physiology*, 159, 461-478.

Edgerton, V. R., de Guzman, C. P., Gregor, R. J., Roy, R. R., Hodgson, J. A., et Lovely, R. G. (1991). Trainability of the spinal cord to generate hindlimb stepping patterns in adult spinalized cats. Dans M.Shimamura, S. Grillner, et V. R. Edgerton (Eds.), *Neurobiological basis of human locomotion* (pp. 411-423). Tokyo: Japan scientific societies press.

Edgerton, V. R., Leon, R. D., Harkema, S. J., Hodgson, J. A., London, N., Reinkensmeyer, D. J., Roy, R. R., Talmadge, R. J., Tillakaratne, N. J., Timoszyk, W., et Tobin, A. (2001). Retraining the injured spinal cord. *Journal of Physiology*, 533, 15-22.

Edgerton, V. R., Roy, R. R., Hodgson, J. A., Prober, R. J., de Guzman, C. P., et de Leon, R. (1992). Potential of adult mammalian lumbosacral spinal cord to execute and acquire improved locomotion in the absence of supraspinal input. *J.Neurotrauma*, 9 Suppl 1, S119-S128.

Edgley, S. A. et Jankowska, E. (1987a). An interneuronal relay for group I and II muscle afferents in the midlumbar segments of the cat spinal cord. *Journal of Physiology*, 389, 647-674.



Edgley, S. A. et Jankowska, E. (1987b). Field potentials generated by group II muscle afferents in the middle lumbar segments of the cat spinal cord. *Journal of Physiology*, 385, 393-413.

Edgley, S. A., Jankowska, E., Krutki, P., et Hammar, I. (2003). Both dorsal horn and lamina viii interneurons contribute to crossed reflexes from feline group ii muscle afferents. *J.Physiol.*

Edgley, S. A., Jankowska, E., et Shefchyk, S. (1988). Evidence that mid-lumbar neurones in reflex pathways from group II afferents are involved in locomotion in the cat. *Journal of Physiology*, 403, 57-71.

Eidelberg, E., Story, J. L., Meyer, B. L., et Nystel, J. (1980). Stepping by chronic spinal cats. *Experimental Brain Research*, 40, 241-246.

Engberg, I. et Lundberg, A. (1969). An electromyographic analysis of muscular activity in the hindlimb of the cat during unrestrained locomotion. *Acta Physiol Scand.*, 75, 614-630.

English, A. W. et Weeks, O. I. (1987). An anatomical and functional analysis of cat biceps femoris and semitendinosus muscles. *J.Morphol.*, 191, 161-175.

Fedirchuk, B., Nielsen, J., Petersen, N., et Hultborn, H. (1998). Pharmacologically evoked fictive motor patterns in the acutely spinalized marmoset monkey (*Callithrix jacchus*). *Exp Brain Res.*, 122, 351-361.

Feldman, A. G. et Orlovsky, G. N. (1975). Activity of interneurons mediating reciprocal Ia inhibition during locomotion. *Brain Research*, 84, 181-194.

Floeter, M. K., Sholomenko, G. N., Gossard, J.-P., et Burke, R. E. (1993). Disynaptic excitation from the medial longitudinal fasciculus to lumbosacral motoneurons: modulation by repetitive activation, descending pathways, and locomotion. *Experimental Brain Research*, 92, 407-419.

Forssberg, H. (1979). Stumbling corrective reaction: a phase-dependent compensatory reaction during locomotion. *Journal of Neurophysiology*, 42, 936-953.

- Forssberg, H. et Grillner, S. (1973). The locomotion of the acute spinal cat injected with clonidine i.v. *Brain Research*, 50, 184-186.
- Forssberg, H., Grillner, S., et Halbertsma, J. (1980a). The locomotion of the low spinal cat. I. Coordination within a hindlimb. *Acta Physiol Scand.*, 108, 269-281.
- Forssberg, H., Grillner, S., Halbertsma, J., et Rossignol, S. (1980b). The locomotion of the low spinal cat: II. Interlimb coordination. *Acta Physiol Scand.*, 108, 283-295.
- Forssberg, H., Grillner, S., et Rossignol, S. (1977). Phasic gain control of reflexes from the dorsum of the paw during spinal locomotion. *Brain Research*, 132, 121-139.
- Fujito, Y. et Aoki, M. (1995). Monosynaptic rubrospinal projections to distal forelimb motoneurons in the cat. *Experimental Brain Research*, 105, 181-190.
- Fung, J., Stewart, J. E., et Barbeau, H. (1990). The combined effects of clonidine and cyproheptadine with interactive training on the modulation of locomotion in spinal cord injured subjects. *J.Neurol.Sci.*, 100, 85-93.
- Garcia-Rill, E. et Skinner, R. D. (1987). The mesencephalic locomotor region ii. Projections to reticulospinal neurons. *Brain Research*, 411, 13-20.
- Garcia-Rill, E., Skinner, R. D., Gilmore, S. A., et Owings, R. (1983). Connections of the mesencephalic locomotor region (MLR). II. Afferents and efferents. *Brain Res.Bull.*, 10, 63-71.
- Gaunt, R. A. et Prochazka, A. (2006). Control of urinary bladder function with devices: successes and failures. *Prog.Brain Res.*, 152, 163-194.
- Gerasimenko, Y. P., Avelev, V. D., Nikitin, O. A., et Lavrov, I. A. (2003). Initiation of locomotor activity in spinal cats by epidural stimulation of the spinal cord. *Neurosci Behav.Physiol*, 33, 247-254.

Gerasimenko, Y. P., Lavrov, I. A., Bogacheva, I. N., Shcherbakova, N. A., Kucher, V. I., et Musienko, P. E. (2005). Formation of locomotor patterns in decerebrate cats in conditions of epidural stimulation of the spinal cord. *Neurosci.Behav.Physiol*, 35, 291-298.

Gerasimenko, Y. P., Makarovskii, A. N., et Nikitin, O. A. (2002). Control of locomotor activity in humans and animals in the absence of supraspinal influences. *Neurosci Behav.Physiol*, 32, 417-423.

Gimenez y Ribotta, M., Provencher, J., Feraboli-Lohnherr, D., Rossignol, S., Privat, A., et Orsal, D. (2000). Activation of locomotion in adult chronic spinal rats is achieved by transplantation of embryonic raphe cells reinnervating a precise lumbar level. *Journal of Neuroscience*, 20, 5144-5152.

Giroux, N., Brustein, E., Chau, C., Barbeau, H., Reader, T. A., et Rossignol, S. (1998). Differential effects of the noradrenergic agonist clonidine on the locomotion of intact, partially and completely spinalized adult cats. Dans O.Kiehn, R. M. Harris-Warrick, L. M. Jordan, H. Hultborn, et N. Kudo (Eds.), *Neuronal mechanisms for generating locomotor activity* (pp. 517-520). New York.

Giroux, N., Reader, T. A., et Rossignol, S. (2001). Comparison of the effect of intrathecal administration of clonidine and yohimbine on the locomotion of intact and spinal cats. *Journal of Neurophysiology*, 85, 2516-2536.

Giroux, N., Rossignol, S., et Reader, T. A. (1999). Autoradiographic study of  $\alpha_1$ -,  $\alpha_2$ -Noradrenergic and Serotonin  $1A$  receptors in the spinal cord of normal and chronically transected cats. *Journal of Comparative Neurology*, 406, 402-414.

Giszter, S. F., Mussa-Ivaldi, F. A., et Bizzi, E. (1993). Convergent force fields organized in the frog's spinal cord. *Journal of Neuroscience*, 13, 467-491.

Goldberger, M. E. et Murray, M. (1988). Patterns of sprouting and implications for recovery of function. *Adv.Neurol.*, 47, 361-385.

- Gorassini, M. A., Prochazka, A., Hiebert, G. W., et Gauthier, M. J. A. (1994). Corrective responses to loss of ground support during walking I. Intact cats. *Journal of Neurophysiology*, 71, 603-609.
- Gorska, T., Bem, T., et Majczynski, H. (1990). Locomotion in cats with ventral spinal lesions: support patterns and duration of support phases during unrestrained walking. *Acta Neurobiol. Exp.*, 50, 191-200.
- Goslow, G. E. j., Reinking, R. M., et Stuart, D. G. (1973). The cat step cycle: hind limb joint angles and muscle lengths during unrestrained locomotion. *J. Morphol.*, 141, 1-42.
- Gossard, J.-P., Brownstone, R. M., Barajon, I., et Hultborn, H. (1994). Transmission in a locomotor-related group Ib pathway from hindlimb extensor muscles in the cat. *Experimental Brain Research*, 98, 213-228.
- Gossard, J.-P., Floeter, M. K., Degtyarenko, A. M., Simon, E. S., et Burke, R. E. (1996). Disynaptic vestibulospinal and reticulospinal excitation in cat lumbosacral motoneurons: modulation during fictive locomotion. *Experimental Brain Research*, 109, 277-288.
- Gray, J. et Lissmann, H. W. (1946a). Further observations on the effect of de-afferentation on the locomotory activity of amphibian limbs. *J. Exp. Biol.*, 23, 121-132.
- Gray, J. et Lissmann, H. W. (1946b). The co-ordination of limb movements in the amphibia. *J. Exp. Biol.*, 23, 133-142.
- Grillner, S. (1975). Locomotion in vertebrates: central mechanisms and reflex interaction. *Physiol. Rev.*, 55, 247-304.
- Grillner, S. (1981). Control of locomotion in bipeds, tetrapods, and fish. Dans J.M. Brookhart et V. B. Mountcastle (Eds.), *Handbook of physiology. The nervous system II*. (pp. 1179-1236). Bethesda, Maryland: Amer. Physiol. Soc.
- Grillner, S. et Rossignol, S. (1978). On the initiation of the swing phase of locomotion in chronic spinal cats. *Brain Research*, 146, 269-277.

Grillner, S. et Zangger, P. (1979). On the central generation of locomotion in the low spinal cat. *Experimental Brain Research*, 34, 241-261.

Guevremont, L., Renzi, C. G., Kowalczewski, J., Saigal, R., and Mushahwar, V. K. (2003). Tonic intraspinal microstimulation of the lumbosacral cord generate rhythmic walking in spinal cats. *Society for Neuroscience Abstracts*, 29, 276.5.

Gustafsson, B. et Jankowska, E. (1976). Direct and indirect activation of nerve cells by electrical pulses applied extracellularly. *Journal of Physiology*, 258, 33-61.

Hagevik, A. et McClellan, A. D. (1999). Coordination of locomotor activity in the lamprey: role of descending drive to oscillators along the spinal cord. *Experimental Brain Research*, 128, 481-490.

Halbertsma, J. M. (1983). The stride cycle of the cat: the modelling of locomotion by computerized analysis of automatic recordings. *Acta Physiol Scand., Suppl.* 521, 1-75.

Harkema, S. J., Hurlay, S. L., Patel, U. K., Requejo, P. S., Dobkin, B. H., et Edgerton, V. R. (1997). Human lumbosacral spinal cord interpret loading during stepping. *Journal of Neurophysiology*, 77, 797-811.

Harrison, P. J., Jankowska, E., et Zytnicki, D. (1986). Laminae VIII interneurons interposed in crossed reflex pathways in the cat. *Journal of Physiology*, 371, 147-166.

He, J., Barolat, G., Holsheimer, J., et Struijk, J. J. (1994). Perception threshold and electrode position for spinal cord stimulation. *Pain*, 59, 55-63.

Helgren, M. E. et Goldberger, M. E. (1993). The recovery of postural reflexes and locomotion following low thoracic hemisection in adult cats involves compensation by undamaged primary afferent pathways. *Exp. Neurol.*, 123, 17-34.

Herman, R., He, J., D'Luzansky, S., Willis, W., et Dilli, S. (2002). Spinal cord stimulation facilitates functional walking in a chronic, incomplete spinal cord injured. *Spinal Cord.*, 40, 65-8.

Hiebert, G. W., Whelan, P. J., Prochazka, A., et Pearson, K. G. (1996). Contribution of hind limb flexor muscle afferents to the timing of phase transitions in the cat step cycle. *Journal of Neurophysiology*, 75, 1126-1137.

Hoffer, J. A., Loeb, G. E., Sugano, N., Marks, W. B., O'Donovan, J., et Pratt, C. A. (1987). Cat hindlimb motoneurons during locomotion: III. Functional segregation in sartorius. *Journal of Neurophysiology*, 57, 554-562.

Holmqvist, B. (1961). Crossed spinal reflex actions evoked by volleys in somatic afferents. *Acta Physiol Scand.*, 52, 1-66.

Holmqvist, B. et Lundberg, A. (1961). Differential supraspinal control of synaptic actions evoked by volleys in the flexion reflex afferents in alpha motoneurons. *Acta Physiol Scand.*, 54, 1-51.

Houk, J. C., Gibson, A. R., Harvey, C. F., Kennedy, P. R., & van Kan, P. L. (1988). Activity of primate magnocellular red nucleus related to hand and finger movements. *Behavioral Brain Research*, 28, 201-206.

Huang, A., Noga, B. R., Carr, P. A., Fedirchuk, B., et Jordan, L. M. (2000). Spinal cholinergic neurons activated during locomotion: localization and electrophysiological characterization. *Journal of Neurophysiology*, 83, 3537-3547.

Hultborn, H., Jankowska, E., et Lindstrom, S. (1971). Relative contribution from different nerves to recurrent depression of Ia IPSPs in motoneurons. *J Physiol*, 215, 637-664.

Ichiyama, R. M., Gerasimenko, Y. P., Zhong, H., Roy, R. R., et Edgerton, V. R. (2005). Hindlimb stepping movements in complete spinal rats induced by epidural spinal cord stimulation. *Neurosci Lett.*, 383, 339-344.

Iwahara, T., Atsuta, Y., Garcia-Rill, E., et Skinner, R. D. (1991a). Locomotion induced by spinal cord stimulation in the neonate rat In Vitro. *Somatosensor.Motor Res.*, 8, 281-287.

Iwahara, T., Atsuta, Y., Garcia-Rill, E., et Skinner, R. D. (1991b). Spinal cord stimulation-induced locomotion in the adult cat. *Brain Res.Bull.*, 28, 99-105.

Jankowska, E., Jukes, M. G. M., Lund, S., et Lundberg, A. (1967a). The effect of DOPA on the spinal cord. 5. Reciprocal organization of pathways transmitting excitatory action to alpha motoneurons of flexors and extensors. *Acta Physiol Scand.*, 70, 369-388.

Jankowska, E., Jukes, M. G. M., Lund, S., et Lundberg, A. (1967b). The effects of DOPA on the spinal cord. 6. Half centre organization of interneurons transmitting effects from the flexor reflex afferents. *Acta Physiol Scand.*, 70, 389-402.

Jankowska, E. et Lundberg, A. (1981). Interneurons in the spinal cord. *TINS*, 230-235.

Jankowska, E. et Roberts, W. J. (1972). An electrophysiological demonstration of the axonal projections of single spinal interneurons in the cat. *Journal of Physiology*, 222, 597-622.

Jezernik, S., Craggs, M., Grill, W. M., Creasey, G., et Rijkhoff, N. J. (2002). Electrical stimulation for the treatment of bladder dysfunction: current status and future possibilities. *Neurol.Res.*, 24, 413-430.

Jiang, W. et Drew, T. (1996). Effects of bilateral lesions of the dorsolateral funiculi and dorsal columns at the level of the low thoracic spinal cord on the control of locomotion in the adult cat: I. Treadmill walking. *Journal of Neurophysiology*, 76, 849-866.

Jilge, B., Minassian, K., Rattay, F., Pinter, M. M., Gerstenbrand, F., Binder, H., et Dimitrijevic, M. R. (2004). Initiating extension of the lower limbs in subjects with complete spinal cord injury by epidural lumbar cord stimulation. *Experimental Brain Research*, 154, 308-326.

Johansson, H. & Silfvenius, H. (1977). Input from ipsilateral proprio- and exteroceptive hind limb afferents to nucleus Z of the cat medulla oblongata. *J. Physiol*, 265, 371-393.

Jordan, L. M. (1991). Brainstem and spinal cord mechanisms for the initiation of locomotion. Dans M. Shimamura, S. Grillner, et V. R. Edgerton (Eds.), *Neurobiological basis of human locomotion* (pp. 3-20). Tokyo: Japan scientific societies press.

- Kanda, K. et Sato, H. (1983). Reflex responses of human thigh muscles to non-noxious sural stimulation during stepping. *Brain Research*, 288, 378-380.
- Kazennikov, O. V., Shik, M. L., et Yakovleva, G. V. (1983). Stepping movements induced in cats by stimulation of the dorsolateral funiculus of the spinal cord. *Bull.Exp.Biol.Med.*, 96, 1036.
- Kiehn, O. et Butt, S. J. (2003). Physiological, anatomical and genetic identification of CPG neurons in the developing mammalian spinal cord. *Prog.Neurobiol.*, 70, 347-361.
- Kiehn, O., Iizuka, M., et Kudo, N. (1992). Resetting from low threshold afferents of N-methyl-D-aspartate-induced locomotor rhythm in the isolated spinal cord-hindlimb preparation from newborn rats. *Neurosci.Lett.*, 148, 43-46.
- Kiehn, O. et Kjaerulff, O. (1998). Distribution of central pattern generators for rhythmic motor outputs in the spinal cord of limbed vertebrates. *Ann.N.Y.Acad.Sci.*, 860, 110-129.
- Kirkwood, P. A., Schomburg, E. D., et Steffens, H. (1987). Facilitatory interaction in spinal reflex pathways from nociceptive cutaneous afferents and identified secondary spindle afferents in the cat. *Experimental Brain Research*, 68, 657-660.
- Kjaerulff, O. et Kiehn, O. (1996). Distribution of networks generating and coordinating locomotor activity in the neonatal rat spinal cord *in vitro*: a lesion study. *Journal of Neuroscience*, 16, 5777-5794.
- Knutsson, E. et Richards, C. L. (1979). Different types of disturbed motor control in gait of hemiparetic patients. *Brain*, 102, 405-430.
- Koerber, H. R., Mirnics, K., Brown, P. B., et Mendell, L. M. (1994). Central sprouting and functional plasticity of regenerated primary afferents. *Journal of Neuroscience*, 14, 3655-3671.
- Kostyuk, P. G. et Vasilenko, D. A. (1979). Spinal interneurons. *Ann.Rev.Physiol.*, 41, 115-126.



Kostyuk, P. G., Vasilenko, D. A., et Lang, E. (1971). Propriospinal pathways in the dorsolateral funiculus and their effects on lumbosacral motoneuronal pools. *Brain Research*, 28, 233-249.

Koulousakis, A., Buchhaas, U., et Nittner, K. (1987). Application of SCS for movement disorders and spasticity. *Acta Neurochir. Suppl (Wien.)*, 39, 112-116.

Kriellaars, D. J., Brownstone, R. M., Noga, B. R., et Jordan, L. M. (1994). Mechanical entrainment of fictive locomotion in the decerebrate cat. *Journal of Neurophysiology*, 71, 1-13.

Krutki, P., Jankowska, E., et Edgley, S. A. (2003). Are crossed actions of reticulospinal and vestibulospinal neurons on feline motoneurons mediated by the same or separate commissural neurons? *Journal of Neuroscience*, 23, 8041-8050.

Kuhta, P. C. & Smith, J. L. (1990). Scratch responses in normal cats: hindlimb kinematics and muscle synergies. *Journal of Neurophysiology*, 64, 1653-1667.

Kuypers, H. G. (1982). A new look at the organization of the motor system. *Prog. Brain Res.*, 57, 381-403.

Kuypers, H. G. J. M. (1963). The organization of the "motor system". *Int. J. Neurol.*, 4, 78-91.

Kuypers, H. G. J. M. (1964). The descending pathways to the spinal cord: their anatomy and function. *Prog. Brain Res.*, 11, 178-202.

LaBella, L., Niechaj, A., et Rossignol, S. (1992). Low-threshold, short-latency cutaneous reflexes during fictive locomotion in the "semi-chronic" spinal cat. *Experimental Brain Research*, 91, 236-248.

Lafreniere-Roula, M. et McCrea, D. A. (2005). Deletions of rhythmic motoneuron activity during fictive locomotion and scratch provide clues to the organization of the mammalian central pattern generator. *J Neurophysiol*, 94, 1120-1132.

Lam, T. et Pearson, K. G. (2001). Proprioceptive modulation of hip flexor activity during the swing phase of locomotion in decerebrate cats. *Journal of Neurophysiology*, 86, 1321-1332.

Lam, T. et Pearson, K. G. (2002). The role of proprioceptive feedback in the regulation and adaptation of locomotor activity. *Adv.Exp.Med.Biol.*, 508, 343-355.

Langlet, C., Leblond, H., et Rossignol, S. (2005). The mid-lumbar segments are needed for the expression of locomotion in chronic spinal cats. *Journal of Neurophysiology*, 93, 2474-2488.

Lawrence, D. G. et Kuypers, H. G. J. M. (1968a). The functional organization of the motor system in the monkey. I. The effects of bilateral pyramidal lesions. *Brain*, 91, 1-15.

Lawrence, D. G. et Kuypers, H. G. J. M. (1968b). The functional organization of the motor system in the monkey. II. The effects of lesions of the descending brain-stem pathways. *Brain*, 91, 15-36.

Leblond, H., Marcoux, J., and Rossignol, S. (2001). The relative importance of midlumbar segments in real and fictive locomotion of spinal cats. *Society for Neuroscience Abstracts*, 27.

Leblond, H., Ménard, A., et Gossard, J.-P. (2000). Bulbospinal control of spinal cord pathways generating locomotor extensor activities in the cat. *Journal of Physiology*.

Leblond, H. and Rossignol, S. (2003). Intraspinal injections of yohimbine in midlumbar segments block spontaneous decerebrate locomotion in cats. *Society for Neuroscience Abstracts*, 29.

Leis, A. A., Kronenberg, M. F., Stetkarova, I., Paske, W. C., et Stokic, D. S. (1996). Spinal motoneuron excitability after acute spinal cord injury in humans. *Neurology*, 47, 231-237.

Lemay, M. A. et Grill, W. M. (2004). Modularity of motor output evoked by intraspinal microstimulation in cats. *J Neurophysiol*, 91, 502-514.

Lennard, P. R. (1985). Afferent perturbations during "monopodal" swimming movements in the turtle: Phase-dependent cutaneous modulation and proprioceptive resetting of the locomotor rhythm. *Journal of Neuroscience*, 5, 1434-1445.

Liberson, W. T., Holmquest, H. J., Scot, D., et Dow, M. (1961). Functional electrotherapy: stimulation of the peroneal nerve synchronized with the swing phase of the gait of hemiplegic patients. *Arch.Phys.Med.Rehabil.*, 42, 101- 105.

Lissmann, H. W. (1946). The neurological basis of the locomotory rhythm in the spinal dogfish (*Scyllium canicula*, *acanthias vulgaris*). II. The effect of de-afferentation. *J.Exp.Biol.*, 23, 162-176.

Loeb, G. E. (1993). The distal hindlimb musculature of the cat: interanimal variability of locomotor activity and cutaneous reflexes. *Experimental Brain Research*, 96, 125-140.

Lovely, R. G., Gregor, R. J., Roy, R. R., et Edgerton, V. R. (1986). Effects of training on the recovery of full-weight-bearing stepping in the adult spinal cat. *Exp.Neurol.*, 92, 421-435.

Lovely, R. G., Gregor, R. J., Roy, R. R., et Edgerton, V. R. (1990). Weight-bearing hindlimb stepping in treadmill-exercised adult spinal cat. *Brain Research*, 514, 206-218.

Low, J. S., Mantle-St John, L. A., & Tracey, D. J. (1986). Nucleus z in the rat: spinal afferents from collaterals of dorsal spinocerebellar tract neurons. *J.Comp Neurol.*, 243, 510-526.

Lundberg, A. (1979). Multisensory control of spinal reflex pathways. Dans R.Granit et O. Pompeiano (Eds.), *Reflex control of posture and movement* (50 ed., pp. 11-28). North-Holland: Elsevier.

Lundberg, A., Malmgren, K., et Schomburg, E. D. (1987a). Reflex pathways from group II muscle afferents 1. Distribution and linkage of reflex actions to □-motoneurones. *Experimental Brain Research*, 65, 271-281.

Lundberg, A., Malmgren, K., et Schomburg, E. D. (1987b). Reflex pathways from group II muscle afferents. 2. Functional characteristics of reflex pathways to alpha- motoneurons. *Experimental Brain Research*, 65, 282-293.

Lundberg, A., Malmgren, K., et Schomburg, E. D. (1987c). Reflex pathways from group II muscle afferents. 3. Secondary spindle afferents and the FRA: a new hypothesis. *Experimental Brain Research*, 65, 294-306.

Mackel, R. & Miyashita, E. (1993). Nucleus Z: a somatosensory relay to motor thalamus. *Journal of Neurophysiology*, 69, 1607-1620.

Magnuson, D. S., Trinder, T. C., Zhang, Y. P., Burke, D., Morassutti, D. J., et Shields, C. B. (1999). Comparing deficits following excitotoxic and contusion injuries in the thoracic and lumbar spinal cord of the adult rat. *Exp.Neurol.*, 156, 191-204.

Maiman, D. J., Mykleburst, J. B., et Barolat-Romana, G. (1987). Spinal cord stimulation for amelioration of spasticity: experimental results. *Neurosurgery*, 21, 331-3.

Marchetti, C., Beato, M., et Nistri, A. (2001a). Alternating rhythmic activity induced by dorsal root stimulation in the neonatal rat spinal cord in vitro. *J.Physiol*, 530, 105-112.

Marcoux, J. et Rossignol, S. (2000). Initiating or blocking locomotion in spinal cats by applying noradrenergic drugs to restricted lumbar spinal segments. *Journal of Neuroscience*, 20, 8577-8585.

Matsushima, T. et Grillner, S. (1992). Neural mechanisms of intersegmental coordination in lamprey: local excitability changes modify the phase coupling along the spinal cord. *Journal of Neurophysiology*, 67, 373-388.

Matsuyama, K. & Drew, T. (2000a). Vestibulospinal and Reticulospinal Neuronal Activity During Locomotion in the Intact Cat. I. Walking on a Level Surface. *Journal of Neurophysiology*, 84, 2237-2256.

Matsuyama, K. & Drew, T. (2000b). Vestibulospinal and Reticulospinal Neuronal Activity During Locomotion in the Intact Cat. II. Walking on an Inclined Plane. *Journal of Neurophysiology*, 84, 2257-2276.

Matsuyama, K., Nakajima, K., Mori, F., Aoki, M., et Mori, S. (2004). Lumbar commissural interneurons with reticulospinal inputs in the cat: morphology and discharge patterns during fictive locomotion. *J Comp Neurol.*, 474, 546-561.

McClellan, A. D. et Hagevik, A. (1999). Coordination of spinal locomotor activity in the lamprey: long-distance coupling of spinal oscillators. *Experimental Brain Research*, 126, 93-108.

McCrea, D. A., Pratt, C. A., et Jordan, L. M. (1980). Renshaw cell activity and recurrent effects on motoneurons during fictive locomotion. *Journal of Neurophysiology*, 44, 475-488.

McHanwell, S. et Biscoe, T. J. (1981). The sizes of motoneurons supplying hindlimb muscles in the mouse. *Proc.R.Soc.Lond B Biol.Sci.*, 213, 201-216.

Mori, S., Shik, M. L., et Yagodnitsyn, A. S. (1977). Role of pontine tegmentum for locomotor control in mesencephalic cat. *Journal of Neurophysiology*, 40, 284-295.

Mortin, L. I., Keifer, J., et Stein, P. S. (1985). Three forms of the scratch reflex in the spinal turtle: movement analyses. *Journal of Neurophysiology*, 53, 1501-1516.

Mortin, L. I. et Stein, P. S. G. (1989). Spinal cord segments containing key elements of the central pattern generators for three forms of scratch reflex in the turtle. *Journal of Neuroscience*, 9, 2285-2296.

Mushahwar, V. K., Aoyagi, Y., Stein, R. B., et Prochazka, A. (2004). Movements generated by intraspinal microstimulation in the intermediate gray matter of the anesthetized, decerebrate, and spinal cat. *Can.J.Physiol Pharmacol.*, 82, 702-714.

Nicolelis, M. A. (2001). Actions from thoughts. *Nature*, 409, 403-407.

Nicolopoulos-Stournaras, S. et Iles, J. F. (1983). Motor neuron columns in the lumbar spinal cord of the rat. *J.Comp Neurol.*, 217, 75-85.

Noga, B. R., Fortier, P. A., Kriellaars, D. J., Dai, X., Detillieux, G. R., et Jordan, L. M. (1995). Field potential mapping of neurons in the lumbar spinal cord activated following stimulation of the mesencephalic locomotor region. *Journal of Neuroscience*, 15, 2203-2217.

Noga, B. R., Kriellaars, D., Brownstone, R. M., et Jordan, L. M. (2003). Mechanism for activation of locomotor centers in the spinal cord by stimulation of the mesencephalic locomotor regions. *Journal of Neurophysiology*, 12, 1464-1478.

Noga, B. R., Kriellaars, D. J., et Jordan, L. M. (1991). The effect of selective brainstem or spinal cord lesions on treadmill locomotion evoked by stimulation of the mesencephalic or pontomedullary locomotor regions. *Journal of Neuroscience*, 11, 1691-1700.

North, R. B. et Wetzel, F. T. (2002). Spinal cord stimulation for chronic pain of spinal origin: a valuable long-term solution. *Spine*, 27, 2584-2591.

Orlovsky, G. N. (1970a). Connexions of the reticulo-spinal neurons with the "locomotor sections" of the brain stem. *Biophysics*, 15, 178-186.

Orlovsky, G. N. (1970b). Influence of the cerebellum on the reticulo-spinal neurones during locomotion. *Biophysics*, 15, 928-936.

Orlovsky, G. N. (1970c). Work of the reticulo-spinal neurones during locomotion. *Biophysics*, 15, 761-771.

Orlovsky, G. N. (1972a). Activity of rubrospinal neurons during locomotion. *Brain Research*, 46, 99-112.

Orlovsky, G. N. (1972b). The effect of different descending systems on flexor and extensor activity during locomotion. *Brain Research*, 40, 359-371.

Orlovsky, G. N. et Pavlova, G. A. (1972). Effect of removal of the cerebellum on vestibular responses of neurons in various descending tracts in cats. *Neurophysiology*, 4, 235-240.

Orlovsky, G. N., Severin, F. U., et Shik, M. L. (1966). Effect of damage to the cerebellum on the coordination of movement in the dog on running. *Biophysics*, 11, 578-588.

Orlovsky, G. N. et Shik, M. L. (1976). Control of locomotion: a neurophysiological analysis of the cat locomotor system. Dans R. Portez (Ed.), *International review of physiology. Neurophysiology II*. (pp. 281-309). Baltimore: University Park Press.

Panchin, Y. V., Perrins, R. J., et Roberts, A. (1991). The action of acetylcholine on the locomotor central pattern generator for swimming in *Xenopus* embryos. *J. Exp. Biol.*, 161, 527-531.

Pearson, K. G. et Collins, D. F. (1993). Reversal of the influence of group Ib afferents from plantaris on activity in medial gastrocnemius muscle during locomotor activity. *Journal of Neurophysiology*, 70, 1009-1017.

Pearson, K. G., Ramirez, J. M., et Jiang, W. (1992). Entrainment of the locomotor rhythm by group Ib afferents from ankle extensor muscles in spinal cats. *Exp. Brain Res*, 90, 557-566.

Pearson, K. G. et Rossignol, S. (1991). Fictive motor patterns in chronic spinal cats. *Journal of Neurophysiology*, 66, 1874-1887.

Perreault, M.-C., Drew, T., et Rossignol, S. (1993). Activity of medullary reticulospinal neurons during fictive locomotion. *Journal of Neurophysiology*, 69, 2232-2247.

Perreault, M.-C., Rossignol, S., et Drew, T. (1994). Microstimulation of the medullary reticular formation during fictive locomotion. *Journal of Neurophysiology*, 71, 229-245.

Perret, C. et Cabelguen, J.-M. (1976). Central and reflex participation in the timing of locomotor activations of a bifunctional muscle, the semi-tendinosus, in the cat. *Brain Research*, 106, 390-395.

Petersen, N. T., Butler, J. E., Marchand-Pauvert, V., Fisher, R., Ledebt, A., Pyndt, H. S., Hansen, N. L., et Nielsen, J. B. (2001). Suppression of EMG activity by transcranial magnetic stimulation in human subjects during walking. *J.Physiol*, 537, 651-656.

Petko M. et Antal, M. (2000). Propriospinal afferent and efferent connections of the lateral and medial areas of the dorsal horn (laminae I-IV) in the rat lumbar spinal cord. *J.Comp Neurol.*, 422, 312-325.

Petko, M., Veress, G., Vereb, G., Storm-Mathisen, J., et Antal, M. (2004). Commissural propriospinal connections between the lateral aspects of laminae III-IV in the lumbar spinal cord of rats. *J.Comp Neurol.*, 480, 364-377.

Philippson, M. (1905). L'autonomie et la centralisation dans le système nerveux des animaux. *Trav.Lab.Physiol.Inst.Solvay (Bruxelles.)*, 7, 1-208.

Pierrot-Deseilligny, E. et Mazieres, L. (1984). Circuits réflexes de la moëlle épinière chez l'homme. Contrôle au cours du mouvement et rôle fonctionnel(2ième partie). *Rev.Neurol.*, 12, 681-694.

Pinter, M. M., Gerstenbrand, F., et Dimitrijevic, M. R. (2000). Epidural electrical stimulation of posterior structures of the human lumbosacral cord: 3. Control Of spasticity. *Spinal cord*, 38, 524-31.

Porter, R. (1963). Focal stimulation of hypoglossal neurones in the cat. *J.Physiol*, 169, 630-640.

Pratt, C. A., Chanaud, C. M., et Loeb, G. E. (1991). Functionally complex muscles of the cat hindlimb.IV.Intramuscular distribution of movement command signals and cutaneous reflexes in broad, bifunctional thigh muscles. *Experimental Brain Research*, 85, 281-299.

Pratt, C. A. et Jordan, L. M. (1987). Ia inhibitory interneurons and Renshaw cells as contributors to the spinal mechanisms of fictive locomotion. *Journal of Neurophysiology*, 57, 56-71.



- Pratt, C. A. et Loeb, G. E. (1991). Functionally complex muscles of the cat hindlimb. I. Patterns of activation across sartorius. *Experimental Brain Research*, 85, 243-256.
- Prochazka, A., Mushahwar, V. K., et McCreery, D. B. (2001). Neural prostheses. *Journal of Physiology*, 533, 99-109.
- Prochazka, A., Sontag, K. H., et Wand, P. (1978). Motor reactions to perturbations of gait: proprioceptive and somesthetic involvement. *Neurosci.Lett.*, 7, 35-39.
- Rasmussen, S., Chan, A. K., et Goslow, G. E. j. (1978). The cat step cycle: electromyographic patterns for hindlimb muscles during posture and unrestrained locomotion. *J.Morphol.*, 155, 253-270.
- Rattay, F., Minassian, K., et Dimitrijevic, M. R. (2000). Epidural electrical stimulation of posterior structures of the human lumbosacral cord: 2. quantitative analysis by computer modeling. *Spinal Cord.*, 38, 473-489.
- Remy-Neris, O., Barbeau, H., Daniel, O., Boiteau, F., et Bussel, B. (1999). Effects of intrathecal clonidine injection on spinal reflexes and human locomotion in incomplete paraplegic subjects. *Experimental Brain Research*, 129, 433-440.
- Rexed, B. (1952). The cytoarchitectonic organization of the spinal cord in the cat. *Journal of Comparative Neurology*, 96, 415-495.
- Rho, M. J., Lavoie, S., et Drew, T. (1999). Effects of red nucleus microstimulation on the locomotor pattern and timing in the intact cat: A comparison with the motor cortex. *Journal of Neurophysiology*, 81, 2297-2315.
- Ribotta, M. G., Provencher, J., Feraboli-Lohnherr, D., Rossignol, S., Privat, A., et Orsal, D. (2000). Activation of locomotion in adult chronic spinal rats is achieved by transplantation of embryonic raphe cells reinnervating a precise lumbar level. *J Neurosci.*, 20, 5144-5152.
- Richardson, R. R. et McLone, D. G. (1978). Percutaneous epidural neurostimulation for paraplegic spasticity. *Surg.Neurol.*, 9, 153-155.

Riddell J.S et Hadian M (2000). Interneurones in pathways from group II muscle afferents in the lower-lumbar segments of the feline spinal cord. *Journal of Physiology*, 522.1, 109-123.

Roaf, H. E. et Sherrington, C. S. (1910). Further remarks on the mammalian spinal preparation. *Quart.J.Exp.Physiol.*, 3, 209-211.

Robinson, G. A. et Goldberger, M. E. (1986). The development and recovery of motor function in spinal cats. I. The infant lesion effect. *Experimental Brain Research*, 62, 373-386.

Romanes, G. J. (1951). The motor cell columns of the lumbo-sacral spinal cord of the cat. *Journal of Comparative Neurology*, 117, 387-398.

Rossignol, S. (1996). Neural control of stereotypic limb movements. Dans L.B.Rowell et J. T. Sheperd (Eds.), *Handbook of Physiology, Section 12. Exercise: Regulation and Integration of Multiple Systems* (pp. 173-216). New York: Oxford University Press.

Rossignol, S. (2000). Locomotion and its recovery after spinal injury. *Curr.Opin.Neurobiol.*, 10, 708-716.

Rossignol, S., Barbeau, H., et Julien, C. (1986). Locomotion of the adult chronic spinal cat and its modification by monoaminergic agonists and antagonists. Dans M.E.Goldberger, A. Gorio, et M. Murray (Eds.), *Development and plasticity of the mammalian spinal cord* (pp. 323-345). Padova: Fidia Research Series III, Liviana Press.

Rossignol, S., Barbeau, H., and Provencher, J. (1982). Locomotion in the adult chronic spinal cat. *Society for Neuroscience Abstracts*, 8, 163, no.47.1.

Rossignol, S., Bélanger, M., Chau, C., Giroux, N., Brustein, E., Bouyer, L., Grenier, C.-A., Drew, T., Barbeau, H., et Reader, T. (2000). The spinal cat. Dans R.G.Kalb et S. M. Strittmatter (Eds.), *Neurobiology of spinal cord injury* (pp. 57-87). Totowa: Humana Press.

Rossignol, S., Bouyer, L., Barthélemy, D., Langlet, C., et Leblond, H. (2002). Recovery of locomotion in the cat following spinal cord lesions. *Brain Res.Rev.*, 40, 257-266.

Rossignol, S., Brustein, E., Bouyer, L., Marcoux, J., Barthélemy, D., Langlet, C., et Leblond, H. (2004). Adaptive changes of locomotion after central and peripheral lesions. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 82, 617-627.

Rossignol, S., Chau, C., Brustein, E., Bélanger, M., Barbeau, H., et Drew, T. (1996). Locomotor capacities after complete and partial lesions of the spinal cord. *Acta Neurobiol. Exp.*, 56, 449-463.

Rossignol, S., Drew, T., Brustein, E., et Jiang, W. (1999). Locomotor performance and adaptation after partial or complete spinal cord lesions in the cat. Dans M.D.Binder (Ed.), *Peripheral and spinal mechanisms in the neural control of movement* (123 ed., pp. 349-365). Amsterdam: Elsevier.

Rossignol, S., Dubuc, R., et Gossard, J. P. (2006). Dynamic sensorimotor interactions in locomotion. *Physiol Rev.*, 86, 89-154.

Rossignol, S. et Gauthier, L. (1980). An analysis of mechanisms controlling the reversal of crossed spinal reflexes. *Brain Research*, 182, 31-45.

Rossignol, S., Giroux, N., Chau, C., Marcoux, J., Brustein, E., et Reader, T. A. (2001). Pharmacological aids to locomotor training after spinal injury in the cat. *Journal of Physiology*, 533, 65-74.

Rushton, D. N., Donaldson, N. D., Barr, F. M., Harper, V. J., Perkins, T. A., Taylor, P. N., et Tromans, A. M. (1997). Lumbar root stimulation for restoring leg function: results in paraplegia. *Artif. Organs*, 21, 180-182.

Russell, D. F. et Zajac, F. E. (1979). Effects of stimulating Deiter's nucleus and medial longitudinal fasciculus on the timing of the fictive locomotor rhythm induced in cats by DOPA. *Brain Research*, 17, 588-592.

Sabin, C. & Smith, J. L. (1984). Recovery and perturbation of paw-shake responses in spinal cats. *Journal of Neurophysiology*, 51, 680-688.

Saigal, R., Renzi, C., et Mushahwar, V. K. (2004a). Intraspinal microstimulation generates functional movements after spinal-cord injury. *IEEE Trans.Neural Syst.Rehabil.Eng*, 12, 430-440.

Saigal, R., Renzi, C., et Mushahwar, V. K. (2004b). Intraspinal microstimulation generates functional movements after spinal-cord injury. *IEEE Trans.Neural Syst.Rehabil.Eng*, 12, 430-440.

Saltiel, P. et Rossignol, S. (2004). Critical points in the forelimb fictive locomotor cycle of the cat and motor coordination: Effects of phasic retractions and protractions of the shoulder in the cat. *Journal of Neurophysiology*, 92, 1342-1356.

Saltiel, P., Tresch, M. C., et Bizzi, E. (1998). Spinal cord modular organization and rhythm generation: an NMDA iontophoretic study in the frog. *Journal of Neurophysiology*, 80, 2323-2339.

Schmidt, B. J. et Jordan, L. M. (2000). The role of serotonin in reflex modulation and locomotor rhythm production in the mammalian spinal cord. *Brain Res.Bull.*, 53, 689-710.

Schoenen J. et Faull R.L.M. (1990). Spinal cord: cytoarchitectural, dendroarchitectural and myeloarchitectural organization. Dans Academic press (Ed.), *The Human Nervous system* (pp. 19-54). San Diego.

Schomburg, E. D., Petersen, N., Barajon, I., et Hultborn, H. (1998). Flexor reflex afferents reset the step cycle during fictive locomotion in the cat. *Experimental Brain Research*, 122, 339-350.

Schouenborg, J. (2002). Modular organisation and spinal somatosensory imprinting. *Brain Res.Brain Res.Rev.*, 40, 80-91.

Schwab, M. E. (2004). Nogo and axon regeneration. *Curr.Opin.Neurobiol.*, 14, 118-124.

Schwartz, A. B. (2004). Cortical neural prosthetics. *Annu.Rev.Neurosci.*, 27, 487-507.

Shapkova, E. Y. Electrical stimulation of the lumbar enlargement: a technique to induce stepping in paraplegia. International society for gait and posture, Sydney, Australia Plenary 1. 2003.

Shapkova, E. Y. et Schomburg, E. D. (2001). Two types of motor modulation underlying human stepping evoked by spinal cord electrical stimulation (SCES). *Acta Physiol Pharmacol.Bulg.*, 26, 155-157.

Shefchyk, S., McCrea, D. A., Kriellaars, D., Fortier, P., et Jordan, L. (1990). Activity of interneurons within the L4 spinal segment of the cat during brainstem-evoked fictive locomotion. *Experimental Brain Research*, 80, 290-295.

Sherriff, F. E. et Henderson, Z. (1994). A cholinergic propriospinal innervation of the rat spinal cord. *Brain Research*, 634, 150-154.

Sherrington, C. S. (1910a). Flexion-reflex of the limb, crossed extension-reflex, and reflex stepping and standing. *Journal of Physiology*, 40, 28-121.

Sherrington, C. S. (1910b). Remarks on the reflex mechanism of the step. *Brain*, 33, 1-25.

Shik, M. L. (1983). Action of the brainstem locomotor region on spinal stepping generators via propriospinal pathways. Dans C.C.Kao, R. P. Bunge, et P. J. Reier (Eds.), *Spinal cord reconstruction* (pp. 421-434). New York: Raven Press.

Shik, M. L. et Orlovsky, G. N. (1976). Neurophysiology of locomotor automatism. *Physiol.Rev.*, 56, 465-500.

Shik, M. L., Severin, F. V., et Orlovsky, G. N. (1966). Control of walking and running by means of electrical stimulation of the mid-brain. *Biophysics*, 11, 756-765.

Shimamura, M., Kogure, I., et Fuwa, T. (1984). The role of the paralemniscal pontine reticular formation in forelimb stepping of thalamic cats. *Neurosci.Res.*, 1, 393-410.

Skoog, B. et Noga, B. R. (1991). Do noradrenergic descending tract fibres contribute to the depression of transmission from group II muscle afferents following brainstem stimulation in the cat? *Neurosci.Lett.*, 134, 5-8.

Smith, J. L., Carlson-Kuhta, P., et Trank, T. V. (1998). Forms of forward quadrupedal locomotion. III. A comparison of posture, hindlimb kinematics, and motor patterns for downslope and level walking. *Journal of Neurophysiology*, 79, 1702-1716.

Smith, J. L., Chung, S. H., et Zernicke, R. F. (1993). Gait-related motor pattern and hindlimb kinetics for the cat trot and gallop. *Experimental Brain Research*, 94, 308-322.

Smith, J. L., Smith, L. A., Zernicke, R. F., et Hoy, M. (1982). Locomotion in exercised and non-exercised cats cordotomized at two or twelve weeks of age. *Exp.Neurol.*, 76, 393-413.

Smith, J. L., Betts, B., Edgerton, V. R., & Zernicke, R. F. (1980). Rapid ankle extension during paw shakes: Selective recruitment of fast ankle extensors. *Journal of Neurophysiology*, 43, 612-620.

Smith, J. L., Hoy, M. G., Koshland, G. F., Phillips, D. M., & Zernicke, R. F. (1985). Intralimb coordination of the paw-shake response: a novel mixed synergy. *Journal of Neurophysiology*, 54, 1271-1281.

Snow, S., Horch, K. W., et Mushahwar, V. K. (2006). Intraspinal microstimulation using cylindrical multielectrodes. *IEEE Trans.Biomed.Eng.*, 53, 311-319.

Snow, S., Jacobsen, S. C., Wells, D. L., et Horch, K. W. (2006). Microfabricated cylindrical multielectrodes for neural stimulation. *IEEE Trans.Biomed.Eng.*, 53, 320-326.

Steeves, J. D. et Jordan, L. M. (1980). Localization of a descending pathway in the spinal cord which is necessary for controlled treadmill locomotion. *Neurosci.Lett.*, 20, 283-288.

Steeves, J. D. et Jordan, L. M. (1984). Autoradiographic demonstration of the projections from the mesencephalic locomotor region. *Brain Research*, 307, 263-276.

Stein, P. S. G. et Smith, J. L. (1997). Neural and biochemical control strategies for different forms of vertebrate hindlimb locomotor tasks. Dans P.S.G.Stein, S. Grillner, A. I. Selverston, et D. G. Stuart (Eds.), *Neurons, Networks and motor behavior* (Computational Neurosciences series ed., pp. 61-73). MIT Press.

Stein, R. B. et Mushahwar, V. (2005). Reanimating limbs after injury or disease. *Trends Neurosci.*

Sterling, P. et Kuypers, H. G. J. M. (1967). Anatomical organization of the brachial spinal cord of the cat. II. The motoneuron plexus. *Brain Research*, 4, 16-32.

Struijk, J. J., Holsheimer, J., et Boom, H. B. (1993). Excitation of dorsal root fibers in spinal cord stimulation: a theoretical study. *IEEE Trans. Biomed. Eng.*, 40, 632-639.

Suzuki, I., Timerick, S. J. B., et Wilson, V. J. (1985). Body position with respect to the head or body position in space is coded by lumbar interneurons. *Journal of Neurophysiology*, 54, 123-133.

Tai, C., Booth, A. M., de Groat, W. C., et Roppolo, J. R. (2004). Bladder and urethral sphincter responses evoked by microstimulation of S2 sacral spinal cord in spinal cord intact and chronic spinal cord injured cats. *Exp. Neurol.*, 190, 171-183.

Tai, C., Booth, A. M., Robinson, C. J., de Groat, W. C., et Roppolo, J. R. (2003). Multi-joint movement of the cat hindlimb evoked by microstimulation of the lumbosacral spinal cord. *Exp. Neurol.*, 183, 620-627.

Taylor, D. M., Tillery, S. I., et Schwartz, A. B. (2002). Direct cortical control of 3D neuroprosthetic devices. *Science*, 296, 1829-1832.

Tessler, A., Himes, B. T., Artymyshyn, R., Murray, M., et Goldberger, M. E. (1981). Spinal neurons mediate return of substance P following deafferentation of cat spinal cord. *Brain Research*, 230, 263-281.

Tessler, A., Himes, B. T., Soper, K., Murray, M., Goldberger, M. E., et Reichlin, S. (1984). Recovery of substance P but not somatostatin in the cat spinal cord after unilateral lumbosacral dorsal rhizotomy: a quantitative study. *Brain Research*, 305, 95-102.

Tillakaratne, N. J., Mouria, M., Ziv, N. B., Roy, R. R., Edgerton, V. R., et Tobin, A. J. (2000). Increased expression of glutamate decarboxylase (GAD(67)) in feline lumbar spinal cord after complete thoracic spinal cord transection. *J.Neurosci.Res.*, 60, 219-230.

Tresch, M. C. et Bizzi, E. (1999). Responses to spinal microstimulation in the chronically spinalized rat and their relationship to spinal systems activated by low threshold cutaneous stimulation. *Experimental Brain Research*, 129, 401-416.

Tuszynski, M. H. et Gage, F. H. (1995). Bridging grafts and transient nerve growth factor infusions promote long-term central nervous system neuronal rescue and partial functional recovery. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, 92, 4621-4625.

Vanderhorst, V. G. J. M. et Holstege, G. (1997). Organization of lumbosacral motoneuronal cell groups innervating hindlimb, pelvic floor, and axial muscles in the cat. *Journal of Comparative Neurology*, 382, 46-76.

Van Kan, P. L. & McCurdy, M. L. (2001). Role of primate magnocellular red nucleus neurons in controlling hand preshaping during reaching to grasp. *Journal of Neurophysiology*, 85, 1461-1478.

Viala, D., Viala, G., et Jordan, M. (1991). Interneurones of the lumbar cord related to spontaneous locomotor activity in the rabbit. I. Rhythmically active interneurones. *Experimental Brain Research*, 84, 177-186.

Walmsley, B., Hodgson, J. A., et Burke, R. E. (1978). Forces produced by medial gastrocnemius and soleus muscles during locomotion in freely moving cats. *Journal of Neurophysiology*, 41, 1203-1216.



Whiting, W. C., Gregor, R. J., Roy, R. R., et Edgerton, V. R. (1984). A technique for estimating mechanical work of individual muscles in the cat during treadmill locomotion. *J.Biomech.*, 17, 685-694.

Williams, T. L., Sigvardt, K. A., Kopell, N., Ermentrout, G. B., et Remy, M. P. (1990). Forcing of coupled nonlinear oscillators: studies of intersegmental coordination in the lamprey locomotor central pattern generator. *Journal of Neurophysiology*, 64, 862-871.

Woolf, C. J., Shortland, P., et Coggeshall, R. E. (1992). Peripheral nerve injury triggers central sprouting of myelinated afferents. *Nature*, 355, 75-78.

Woolf, C. J., Shortland, P., Reynolds, M., Ridings, J., Doubell, T., et Coggeshall, R. E. (1995). Reorganization of central terminals of myelinated primary afferents in the rat dorsal horn following peripheral axotomy. *J.Comp Neurol.*, 360, 121-134.

Yakovenko, S., Mushahwar, V., VanderHorst, V., Holstege, G., et Prochazka, A. (2002). Spatiotemporal activation of lumbosacral motoneurons in the locomotor step cycle. *Journal of Neurophysiology*, 87, 1542-1553.

Yang, J. F. et Stein, R. B. (1990). Phase-dependent reflex reversal in human leg muscles during walking. *Journal of Neurophysiology*, 63, 1109-1117.

Yang, J. F., Stephens, M. J., et Vishram, R. (1998). Infant stepping: a method to study the sensory control of human walking. *Journal of Physiology*, 507, 927-937.

Yeomans, J., Prior, P., et Bateman, F. (1986). Current-distance relations of axons mediating circling elicited by midbrain stimulation. *Brain Research*, 372, 95-106.

Yu, J. et Eidelberg, E. (1981). Effects of vestibulospinal lesions upon locomotor function in cats. *Brain Research*, 220, 179-183.

Zehr, E. P. et Stein, R. B. (1999). What functions do reflexes serve during human locomotion? *Prog.Neurobiol.*, 58, 185-205.

Zhang, B., Goldberger, M. E., Wu, L. F., et Murray, M. (1995). Plasticity of complex terminals in lamina II in partially deafferented spinal cord: the cat spared root preparation. *Exp.Neurol.*, 132, 186-193.

### **CONTRIBUTION DE L'ÉTUDIANTE À L'ARTICLE 1:**

Dans cet article, j'ai effectué toutes les expériences en collaboration avec le Dr Hugues Leblond, l'assistant de recherche au laboratoire. J'ai de plus effectué toutes les analyses, la plupart étant effectuées avec l'aide de Janyne Provencher, la technicienne de laboratoire. J'ai finalement écrit cet article avec les corrections de mon directeur de recherche, Dr Serge Rossignol.

### **CONTRIBUTION DE L'ÉTUDIANTE À L'ARTICLE 2:**

Dans cet article, j'ai effectué toutes les expériences en collaboration avec le Dr Hugues Leblond, l'assistant de recherche au laboratoire. J'ai de plus effectué les analyses et écrit cet article avec les corrections du Dr Serge Rossignol.